

SÉRIE A, N° 2034

N° D'ORDRE :

2901

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MADELEINE MOREL

1^{re} THÈSE. — L'ACIDE NICOTINIQUE FACTEUR DE CROISSANCE POUR
Proteus vulgaris ; LE TEST *Proteus*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 7 Juillet 1943 devant la Commission d'examen.

MM. SCHAEFFER..... *Président.*

AUBEL..... }
MONNIER..... } *Examineurs.*

MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS, 1943

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Nom du Candidat : MOREL.

Prénom : Madeleine.

Date de la soutenance : 7 juillet 1943

Numéro d'ordre : Série A, 2034, N° 2901

MOREL (Madeleine). — L'acide nicotinique facteur de croissance pour *Proteus vulgaris* ; le test *Proteus*. — Paris, Masson, 1943, in-8°, 105 p. et 10 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1943. Sér. A. 2034, N° 2901.

MOREL (Madeleine). — L'acide nicotinique facteur de croissance pour *Proteus vulgaris* ; le test *Proteus*. — Paris, Masson, 1943, in-8°, 105 p. et 10 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1943. Sér. A. 2034, N° 2901.

MOREL (Madeleine). — L'acide nicotinique facteur de croissance pour *Proteus vulgaris* ; le test *Proteus*. — Paris, Masson, 1943, in-8°, 105 p. et 10 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1943. Sér. A. 2034, N° 2901.

MOREL (Madeleine). — L'acide nicotinique facteur de croissance pour *Proteus vulgaris* ; le test *Proteus*. — Paris, Masson, 1943, in-8°, 105 p. et 10 fig.

Th. Sc. Nat. Paris, 1943. Sér. A. 2034, N° 2901.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 2034

N° D'ORDRE :

2901

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MADELEINE MOREL

1^{re} THÈSE. — L'ACIDE NICOTINIQUE FACTEUR DE CROISSANCE POUR
Proteus vulgaris ; LE TEST *Proteus*.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 7 Juillet 1943 devant la Commission d'examen.

MM. SCHAEFFER..... *Président.*

AUBEL..... } *Examineurs.*
MONNIER..... }

MONOGRAPHIES DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS, 1943

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyens honoraires { M. MOLLIARD.
C. MAURAIN.

Doyen P. MONTEL, *Professeur*, Théorie des Fonctions.

Professeurs honoraires.	{	Léon BRILLOUIN.	G. BERTRAND.	E. CARTAN.
		AUGER.	Ch. FABRY.	E. BOREL.
		DANGEARD.	Léon BERTRAND.	A. COTTON.
		LESPIEAU.	WINTREBERT.	J. DRACH.
		VESSIOT.	BOHN.	M. GUICHARD.
		PORTIER.	RABAUD.	LABROUSTE.
		LAPICQUE.	CAULLERY.	

PROFESSEURS

Charles PÉREZ... T Zoologie. L. BLARINGHEM... T Botanique. G. JULIA... T Analyse supérieure et Algèbre supérieure. C. MAUGUIN... T Minéralogie. A. DENJOY... T Géométrie supérieure. L. LUTAUD... T Géographie physique et Géologie dynamique. G. BRUHAT... T Physique. E. DARMOIS... T Enseignement de Physique. A. DENIERNE... T Physique générale et Radioactivité. L. DUNOYER... T Chimie-Physique. M. JAVILLIER... T Chimie biologique. Henri VILLAT... T Mécanique des fluides et applications. Ch. JACOB... T Géologie. P. PASCAL... T Chimie générale. M. FRÉCHET... T Calcul des probabilités et Physique mathématique. E. ESCLANGON... T Astronomie. H. BEGHIN... T Mécanique physique et expérimentale. FOCH... T Mécanique expérimentale des fluides. PAUTHENIER... T Electrotechnique générale. De BROGLIE... T Théories physiques. CHRÉTIEN... Optique appliquée. PRENANT... T Anatomie et Histologie comparées. VILLEY... T Mécanique physique et expérimentale. COMBES... T Physiologie végétale. GARNIER... T Application de l'analyse à la géométrie. PÉRÈS... T Mécanique rationnelle. HACKSPILL... T Chimie minérale. TOUSSAINT... Technique aéronautique. M. CURIE... Physique (P. C. B.). G. RIBAUD... T Hautes températures. CHAZY... T Mécanique analytique.	GAULT... T Chimie (P. C. B.). CROZE... T Physique théorique et Physique céleste. DUPONT... T Théories chimiques. VALIRON... T Calcul différentiel et intégral. BARRABÉ... Géologie structurale et géologie appliquée. MILLOT... Biologie animale (P. C. B.). F. PERRIN... Théories physiques. VAVON... T Analyse et mesures chimiques. G. DARMOIS... T Mathématiques générales. CHATTON... T Biologie maritime. AUBEL... Chimie biologique. Jacques BOURCART... Géographie physique et Géologie dynamique. M^{me} JOLIO-CURIE... Physique générale et Radioactivité. PLANTEFOL... Biologie végétale (P. C. B.). CABANNES... T Recherches physiques. GRASSÉ... T Zoologie. Évolution des êtres organisés. PRÉVOST... Chimie organique. BOULIGAND... Mathématiques. CHAUDRON... Chimie (P. C. B.). WYART... Minéralogie. TEISSIER... Zoologie. MANGENOT... Biologie végétale (P. C. B.). P. AUGER... Physique. MONNIER... Physiologie générale. PIVETEAU... Géologie. ROCARD... Physique. H. CARTAN... Calcul différentiel. SCHAEFFER... T Physio'ogie générale. LAFFITTE... Chimie (P. C. B.). LERAY... Mécanique théorique des fluides. FAVART... Calcul des Probabilités et Physique Mathématique.
---	--

Secrétaire..... C MONIER

Secrétaires honoraires..... { D. TOMBECK
A. PACAUD.



*Travail du Service de Physiologie Microbienne
de l'Institut Pasteur*

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER. — TECHNIQUE D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE <i>Proteus vul-</i> <i>garis</i> EN FONCTION DE LA NICOTINAMIDE.	3
Mesure du développement bactérien.	4
Choix d'un milieu de culture	4
Entretien des souches	7
Croissance.	7
Etalonnage	8
Erreur et Sensibilité de la méthode	10
CHAPITRE II. — CONDITIONS DE LA STABILITÉ DES RÉACTIONS QUANTITATIVES DE <i>Proteus vulgaris</i> A LA VITAMINE P. P.	12
<i>Constance des résultats obtenus</i>	12
<i>Etude de la souche « P »</i>	13
CHAPITRE III. — INFLUENCE DE DIVERSES SUBSTANCES SUR LE DÉVELOPPEMENT DES SOUCHES N ET P DE <i>Proteus vulgaris</i> EN FONCTION DE LA NICOTINAMIDE	16
Etude de la souche « N »	16
<i>Action de diverses vitamines</i>	16
<i>Action du sérum.</i>	17
<i>Action des acides aminés</i>	17
<i>Action des nitrates</i>	20
<i>Action du fumarate</i>	24
<i>Action du mélange : acides aminés + nitrate.</i>	25
Etude de la souche « P »	25
<i>Action du sérum</i>	25
<i>Action des acides aminés</i>	26
<i>Action des nitrates et du fumarate</i>	27
<i>Action du mélange : acides aminés + nitrate</i>	28
Comparaison des réactions des souches N et P aux diverses substan- ces étudiées.	28
CHAPITRE IV. — USURE DE LA NICOTINAMIDE	31
Usure des coenzymes I et II en présence de glucose	31
<i>Etude de l'activité des systèmes déshydrogénants</i>	31
<i>Etude de la respiration</i>	34
Usure du coenzyme I en présence d'acide pyruvique	38
<i>Adaptation de la souche au pyruvate</i>	38
<i>Usure du coenzyme I</i>	39
<i>Non usure du coenzyme II.</i>	40

	Pages
CHAPITRE V. — RELATION ENTRE LE BESOIN EN NICOTINAMIDE ET LE MÉTABOLISME.	43
<i>Influence de l'oxygénation.</i>	44
<i>Influence des accepteurs d'hydrogène</i>	44
<i>Influence des acides aminés</i>	45
CHAPITRE VI. — RÉACTIONS DU <i>Proteus</i> AUX COENZYMES I ET II	47
<i>Influence sur la croissance.</i>	47
<i>Influence sur la respiration</i>	50
<i>Discussion</i>	51
CHAPITRE VII. — RÉACTIONS DU <i>Proteus</i> A QUELQUES DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE	55
Techniques	56
<i>Technique de Lwoff et Querido</i>	56
<i>Technique de Möller et Birkofer.</i>	56
<i>Technique de Pelczar et Porter</i>	57
Spécificité de la nicotinamide.	57
CHAPITRE VIII. — RÉACTIONS DE DIVERSES BACTÉRIES AUX DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE	63
Activité de l'acide nicotinique, de la nicotinamide et des coenzymes I et II	63
Activité de quelques dérivés de l'acide nicotinique	67
Relation entre la structure et l'activité vitaminique des dérivés de la pyridine pour les bactéries	71
CHAPITRE IX. — SPÉCIFICITÉ DE LA NICOTINAMIDE POUR L'HOMME ET LE CHIEN	74
<i>Test croissance et test thérapeutique.</i>	74
<i>Conclusions</i>	75
CHAPITRE X. — LES TESTS <i>Shigella</i> ET <i>Lactobacillus</i> APPLIQUÉS AU DOSAGE DE LA VITAMINE P. P.	79
<i>Shigella dysenteriae.</i>	79
<i>Shigella paradysenteriae</i>	80
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	81
CHAPITRE XI. — SPÉCIFICITÉ COMPARÉE DES DOSAGES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES	83
<i>Principe des méthodes chimiques de dosage</i>	83
<i>Spécificité des méthodes chimiques de dosage</i>	83
<i>Comparaison avec la spécificité de Proteus vulgaris.</i>	84
CHAPITRE XII. — APPLICATION DU TEST <i>Proteus vulgaris</i> AU DOSAGE DE LA VITAMINE P. P. DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES	86
Technique de dosage dans le sang	87
Technique de dosage dans l'urine	91
Technique de dosage dans le lait	94
Technique de dosage dans les tissus animaux	97
Technique de dosage dans les tissus végétaux	97
CONCLUSIONS.	100

INTRODUCTION

L'acide pyridine- β -carboxylique a été découvert par G. Huber en 1867 parmi les produits d'hydrolyse de la nicotine.

En 1912, Suzuki, Shimamura et Odake réussissent à isoler l'acide nicotinique à partir des polissures de riz. Funk en 1913 cherchant à concentrer la vitamine antinévritique à partir de la levure aboutit à l'acide nicotinique. L'acide pyridine- β -carboxylique était donc connu depuis longtemps en tant que constituant des végétaux. Warburg et Christian en 1932 découvrent le coferment de l'oxydation de l'acide hexose-monophosphorique; ils montrent avec Griese en 1935 qu'il renferme l'amide de l'acide nicotinique.

Davis avait établi, dès 1917, que le bacille de Pfeiffer ne peut se développer dans les milieux peptonés que si ceux-ci sont additionnés de deux facteurs de croissance dont l'un a été appelé « V » (*vitamin-like*) en raison de sa grande fragilité. A. et M. Lwoff, en 1936-1937, ont identifié ce facteur « V » aux coenzymes I et II. L'année suivante, B. C. J. G. Knight démontre que l'un des facteurs de croissance nécessaire à *Staphylococcus aureus* n'est autre que la nicotinamide. C'est à l'acide nicotinique que sera identifié quelques mois plus tard, par Elvehjem, Madden, Strong et Wooley, le facteur P. P. (*Pellagra preventing factor*) dont l'existence était devenue certaine à la suite des travaux de Goldberger et de ses collaborateurs.

A notre connaissance, outre un grand nombre de publications, deux mises au point d'ensemble ont été consacrées à l'acide nicotinique. La première en date est celle de E. Bandier (1940) qui porte surtout sur les propriétés et les méthodes de dosage de l'acide nicotinique et renferme les résultats personnels de cet auteur, relatifs à la teneur de divers tissus animaux en vitamine P. P. La seconde, qui est due à L. Justin-Besançon et A. Lwoff, est un travail d'ensemble dans lequel sont exposées les données biologiques et physiologiques relatives à cette vitamine, et qui comporte en outre une étude des avitaminoses nicotiniques de l'homme et des animaux. Le lecteur trouvera dans ces deux volumes les données générales relatives à l'acide nicotinique et une bibliographie détaillée.

*
* *

La bactérie *Proteus vulgaris* a été pendant très longtemps cultivée dans des milieux complexes à base de peptone. Fildes en 1938 a montré que l'acide nicotinique est le seul facteur de croissance pour ce microbe. Cette observation fondamentale a été le point de départ des travaux de Lwoff et Querido (1938-1939) qui ont étudié les réactions qualitatives et quantitatives de *Proteus* à l'acide nicotinique et à ses dérivés, et ont établi une méthode de dosage de la vitamine P. P. basée sur le développement de cette bactérie.

Nous nous sommes proposé de reprendre la question du développement de *Proteus vulgaris* en fonction de la vitamine P. P. et d'examiner les différents problèmes théoriques et pratiques que pose l'étude des relations entre la vitamine et la bactérie; c'est l'ensemble de ces recherches qui est exposé ici. Le premier chapitre comporte essentiellement un exposé détaillé de la technique indiquée par Lwoff et Querido pour l'étude du développement de *Proteus vulgaris* en fonction de la vitamine P. P. Nous avons ensuite examiné la question de la stabilité de *Proteus*; une variété est décrite, dérivée de la souche normale qui en diffère par un besoin accru en nicotinamide. L'action de diverses substances sur le développement des bactéries en fonction de la nicotinamide a été examinée en détail. Le problème de l'usure de la nicotinamide et des coenzymes I et II a fait l'objet de nombreuses expériences. L'exposé de nos recherches personnelles est accompagné et suivi d'une mise au point des connaissances actuelles sur le rôle de l'acide nicotinique en tant que facteur de croissance et sur la spécificité de ses dérivés pour le *Proteus* et diverses bactéries : *Shigella*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptobacterium*. Nous avons en outre essayé de dégager quelques lois générales relatives aux relations entre la structure des dérivés de la pyridine et leur activité vitaminique aussi bien pour les bactéries que pour l'homme et pour le chien. Enfin, nous avons étudié et décrit les différentes techniques de dosage de la vitamine P. P. dans les milieux biologiques au moyen du test *Proteus*.

*
* *

Les recherches exposées ici ont été effectuées dans le Service de Physiologie Microbienne de l'Institut Pasteur. Le docteur A. Lwoff m'a donné le sujet de ce travail et m'a guidée de ses conseils. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à M. E. Aubel qui a bien voulu encourager mon travail et s'y intéresser.

Je tiens enfin à témoigner ma gratitude à M. J. Tréfouël pour le bienveillant accueil que j'ai reçu dans la maison de Pasteur.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE D'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DE *PROTEUS VULGARIS* EN FONCTION DE LA NICOTINAMIDE

D'après la classification américaine (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*), le genre *Proteus* fait partie de la classe des Schizomycetes, ordre des Eubactériales, famille des Entérobactériacées. *Proteus vulgaris* a été décrit pour la première fois par Hauser en 1885. Les *Proteus* sont des bactéries se présentant sous la forme de bâtonnets de proportions variables, mobiles, pÉRITRICHES, non sporogènes, se décolorant par la méthode de Gram. Les caractères de l'espèce *vulgaris* sont les suivants : attaque le glucose avec formation d'acide et un dégagement gazeux visible, n'a aucune action sur le mannitol, fait fermenter le maltose. Le diamètre peut varier de 0,5 à 1 ou 3 μ ; en général, les bactéries sont groupées par paires, ou parfois en chaînes plus ou moins longues; ce sont des aÉROBIES facultatifs.

Weil et Felix ont découvert des variétés de *Proteus* agglutinables par le sérum des malades atteints de typhus exanthématique, qu'ils ont appelées souches X. Ils ont isolé de l'urine de malades atteints de typhus, la fameuse variété X₁, qui est particulièrement sensible à cette réaction d'agglutination.

Fildes (1938) a montré que l'amide de l'acide nicotinique est le seul facteur de croissance pour les *Proteus*; au voisinage de la limite des dilutions actives, il existe une relation entre la concentration du milieu en facteur de croissance et la quantité de bactéries présentes. Lwoff et Querido ont confirmé ces résultats qui leur ont permis d'établir une méthode de dosage microbiologique de l'amide nicotinique et de certains dérivés pyridiniques voisins. Nous avons toujours utilisé la technique originale de Lwoff et Querido, qui sera exposée dans les pages qui vont suivre. Nous n'avons eu à y introduire que des modifications de détail qui seront indiquées dans ce chapitre.

MESURE DU DÉVELOPPEMENT BACTÉRIEN

Il était nécessaire, pour des expériences quantitatives, d'être en possession d'une méthode permettant d'évaluer de manière précise la croissance bactérienne. Lwoff et Querido ont utilisé la densité optique des cultures mesurée à l'électrophotomètre de P. Meunier. Dans leurs travaux, et par suite dans tous les nôtres, les mesures sont exprimées par la graduation du coin photométrique de l'appareil ; une division correspond, pour notre appareil (deuxième modèle de l'électrophotomètre), à une variation de densité optique de 0,0035 pour une lumière filtrée de λ moyenne efficace de 0,55 μ environ. La cuve employée a toujours une épaisseur utile de 10 mm. Pour obtenir la densité optique propre d'une culture, il faut naturellement soustraire du chiffre lu celui correspondant à l'absorption de la cuve contenant le milieu de culture non ensemencé.

Pour justifier entièrement le choix de cet appareil, il fallait vérifier que pour une même culture les chiffres obtenus étaient proportionnels à la dilution. Lwoff et Querido ont montré que ceci est réalisé : si l'on porte en ordonnées les divisions de l'appareil de Meunier et en abscisses les dilutions de la culture étudiée, on obtient une droite passant par l'origine. Ceci bien entendu, dans les limites des erreurs de lecture de l'appareil.

Le *Proteus* n'a aucune tendance à former des grumeaux ou un voile, il donne des suspensions parfaitement homogènes et se prête particulièrement bien à des mesures photométriques.

Pour fixer les idées, disons que : 10 cm³ d'une culture de *Proteus* en voie de croissance, âgée de 16 heures environ, effectuée en milieu synthétique en présence d'un excès d'acide nicotinique et dont la densité optique est de 100 divisions de notre photomètre, contiennent après trois lavages 0,179 mg d'azote : moyenne de quatre déterminations effectuées par la méthode de Kjeldahl (micro-méthode).

CHOIX D'UN MILIEU DE CULTURE

Depuis que Fildes a montré que *Proteus vulgaris* se développait en milieu synthétique en présence d'acide nicotinique, différentes formules de milieu ont été proposées pour la culture de cette bactérie ; nous allons les examiner en détail. Il est important en effet pour établir une méthode de dosage fondée sur la croissance de ce microorganisme de travailler avec un milieu de culture approprié. Ce milieu :

1° doit permettre un bon développement de *Proteus vulgaris* sans que celui-ci forme de voile ni de grumeaux,

2° aucun des constituants du milieu ne doit précipiter,

3° il ne doit pas se développer dans les cultures de pigment qui puisse gêner les mesures photométriques,

4° la vitamine P. P. doit être le seul facteur limitant la croissance,

5° le développement ne doit pas être influencé par des substances autres que la vitamine P. P. La réalisation de cette condition dépendra, nous le verrons, non seulement du milieu mais de la souche utilisée.

Fildes en 1938 a constaté que *Proteus vulgaris*, en présence d'acide ou d'amide nicotinique, se développait bien dans un milieu de culture à base de lactate de sodium et de chlorure d'ammonium ayant la formule suivante :

PO_4KH_2	4,5 gr.
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,5 gr.
ClNH_4	0,5 gr.
Lactate de sodium M/2 . . .	50 cm^3
Eau	900 cm^3

Le pH était ajusté à 7,6, le milieu réparti à raison de 9 cm^3 par tube et autoclavé. Les solutions suivantes étaient ensuite ajoutées stérilement à chaque tube :

a) Sulfate ferreux ammoniacal M/500 dans HCl M. 50 (stérilisé par filtration) : 0,25 cm^3 ,

b) SO_4Mg , 7 H_2O en solution à 0,4 o/o dans l'eau (autoclavé) : 0,1 cm^3 ,

c) H_2O bidistillée stérile pour compléter à 10 cm^3 .

Fildes avait utilisé un échantillon de lactate de sodium préparé à partir de lactate de zinc recristallisé trois fois.

L'acide nicotinique, autoclavé, à la concentration de $10^{-3} \times \text{M}$ était ajouté à raison de 0,2 cm^3 par tube ; soit une concentration finale dans le milieu de culture de $2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Lwoff et Querido ont légèrement modifié le milieu de Fildes :

a) le lactate de sodium est remplacé par du glucose, dont on peut trouver des préparations très purifiées dans le commerce (marque Fränkel et Landau, par exemple). D'autres échantillons se sont trouvés renfermer des quantités d'acide nicotinique de l'ordre de 10 à 20 γ pour 100 gr. ;

b) le sulfate ferreux ammoniacal est remplacé par du citrate de fer qui peut, sans inconvénient, être stérilisé à l'autoclave,

c) le sulfate de magnésium est introduit dans le milieu de culture avant stérilisation. Il était à craindre qu'en présence de phosphate, le magnésium ne forme un sel insoluble pendant la stérilisation à l'autoclave ; mais, en fait, les milieux obtenus sont limpides. Remarquons

que ces auteurs utilisent une concentration de MgSO_4 plus de 10 fois plus faible que celle indiquée par Fildes.

Le milieu de base de Lwoff et Querido a la formule suivante :

PO_4KH_2	4,5 gr.
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,75 gr.
KCl	0,5 gr.
MgSO_4	0,05 gr.

eau bidistillée dans un appareil en verre Pyrex ou en quartz : 1 000 cm^3 . ;

NaOH à 40 o/o, q. s. pour pH : 7,5.

Ce milieu est réparti dans des récipients, bouchés avec du coton hydrophile entouré de gaze et stérilisés pendant 20 minutes à 115°. On stérilise d'autre part de la même façon les solutions suivantes :

A = glucose 30 gr., eau bidistillée 100 cm^3 ,

B = citrate ferrique 1 gr., eau bidistillée 1.000 cm^3 .

On ajoute à 95 cm^3 de milieu 1 cm^3 de solution A et 0,5 cm^3 de solution B. Le volume du milieu est ensuite complété à 100 cm^3 par addition de 1,5 cm^3 d'une solution d'acide nicotinique de concentration voulue et de 2 cm^3 de culture souche. Dans ce milieu, on obtient en 24 heures un développement abondant de *Proteus vulgaris*, très supérieur à celui observé dans le milieu à base de lactate.

Pour la souche « X₁₉ Syrie » de la collection de l'Institut Pasteur, d'après Lwoff et Querido, entre pH 6,5 et 7,4, les cultures se développent bien et la croissance correspondant à une quantité donnée de vitamine P. P. est à très peu de chose près la même. A pH 4,0 et 8,2, il n'y a pas de développement.

Le pH du milieu de culture initialement 7,5 (déterminé avec un potentiomètre à électrode de verre) tombe à 7,35-7,30 après stérilisation. Après 30 heures de culture, en présence des quantités de facteur de croissance employées pour les mesures, le pH est de 7,2-7,1, c'est-à-dire que le milieu est suffisamment tamponné pour que le très léger changement de pH ne puisse intervenir de façon appréciable dans le développement bactérien. Pour plus de sécurité cependant, nous avons préféré travailler avec un milieu mieux tamponné et nous avons porté la concentration en phosphate à 9 gr. pour 1 000 cm^3 .

Il est essentiel d'utiliser des échantillons de phosphate très purs ; on n'observe, en effet, aucun développement du *Proteus* si l'on utilise certains échantillons commerciaux soi-disant purs. Nous avons employé les phosphates Sørensen R. A. L. ou Merck qui donnent le même résultat.

ENTRETIEN DES SOUCHES

Nous avons toujours utilisé la souche employée par Lwoff et Querido : *Proteus* « X₁₉ Syrie » de la collection de l'Institut Pasteur. Le *Proteus* X₁₉ d'après Fildes se comporte comme les autres variétés de *Proteus vulgaris*. A la collection de l'Institut Pasteur, la souche repiquée sur milieu peptoné gélosé est mise pendant une nuit à 37° puis conservée à la température du laboratoire. Le repiquage est effectué tous les mois.

La bactérie doit être adaptée au milieu synthétique par ensemencements larges dans ce milieu en présence d'une concentration d'amide de l'acide nicotinique de 2×10^{-6} . L'entretien s'opère par repiquages journaliers à raison de 5 gouttes de semence pour 5 cm³ de milieu.

Pour effectuer les dosages, il est nécessaire d'avoir une souche dite « carencée », c'est-à-dire cultivée en présence d'une faible quantité de facteur de croissance. En pratique, à partir de la souche adaptée au milieu synthétique, on ensemence des tubes de ce milieu contenant 11 gouttes d'acide nicotinique 1×10^{-5} pour 5 cm³ (c'est-à-dire que la concentration en acide nicotinique est de 2×10^{-7}). On effectue dans ces conditions des repiquages en série ; dans les deux premiers, les tubes témoins non additionnés de facteur de croissance montrent un développement abondant. A partir du troisième repiquage en général, l'excès de facteur de croissance apporté par l'ensemencement est éliminé et dans les tubes témoins on n'observe qu'un développement nul ou négligeable. Ces cultures, effectuées en présence de faibles quantités d'acide nicotinique s'altèrent assez rapidement. Il faut donc toujours ensemercer avec une souche « carencée » jeune, c'est-à-dire venant d'épuiser l'acide nicotinique du milieu. En pratique, une souche de 24 heures donne d'excellents résultats.

L'entretien des souches et les dosages doivent être effectués à 28° ; nous verrons dans la suite que ceci est très important.

CROISSANCE

Dans le milieu qui vient d'être décrit, en présence d'une quantité d'amide nicotinique limitant le développement, *Proteus vulgaris* a une courbe de croissance en S caractéristique. C'est bien la quantité d'acide nicotinique qui arrête la croissance car on peut à un moment quelconque obtenir un nouveau départ en ajoutant de la vitamine P. P. La densité optique de la culture, arrêtée faute de facteur de croissance, reste constante pendant plus de 48 heures (Lwoff et Querido). L'expérience montre que pour des cultures bien aérées (ce sera le

cas pour les dosages), le développement maximum est atteint en général au bout de 30 heures. En principe, les mesures seront faites 36 heures après l'ensemencement ; mais on peut aussi bien les faire après 54 ou même 72 heures. Avant d'introduire la culture dans la cuve, il faut l'agiter pendant 20 secondes en prenant garde de ne pas introduire de bulles d'air dans le liquide.

Pour évaluer exactement la croissance bactérienne due à l'acide nicotinique introduit dans le milieu de culture, il faut toujours opérer de la manière suivante : on constitue trois témoins : *a*) milieu non ensemencé, *b*) milieu non ensemencé additionné de la substance à doser (1 cm³ d'extrait pour 9 cm³ de milieu), *c*) milieu ensemencé. Le chiffre lu pour cette dernière culture correspond aux corps microbiens apportés par l'ensemencement et éventuellement au développement dû à des traces d'acide nicotinique pouvant être amené soit avec la semence, soit par une impureté présente dans le milieu (glucose impur par exemple). Pour chaque dosage, du chiffre lu on soustrait la densité optique propre du milieu et de la cuve, celle du liquide biologique étudié, et celle des corps microbiens correspondant à l'ensemencement ou à des impuretés : $c + b - a$. On voit donc qu'il n'est pas absolument indispensable d'utiliser du glucose très pur, totalement exempt d'acide nicotinique, ni d'employer une souche complètement dépourvue de facteur de croissance libre. Cependant, la densité optique du milieu étant de 12 environ, celle du témoin ensemencé varie en général entre 15 et 20 et ne doit pas dépasser cette valeur si on veut se trouver dans des conditions favorables à la précision des dosages.

ÉTALONNAGE

Toutes les conditions décrites étant respectées, le développement de la culture est proportionnel à la concentration du milieu en facteur de croissance dans certaines limites très précises qui varient avec l'oxygénation du milieu de culture. Lwoff et Querido ont montré en effet que : la courbe donnant la densité optique de la culture en fonction de la concentration en nicotinamide du milieu s'infléchit pour une concentration de 0,6 à 0,7 γ pour 100 cm³ lorsqu'il s'agit de tubes de 16 mm. de diamètre contenant 9 cm³ de milieu et vers 1,2 γ pour des fioles d'Erlenmeyer de 100 cm³ contenant 10 cm³ de milieu, le diamètre de la surface libre du liquide étant de 60 mm. On voit donc que la consommation d'acide nicotinique est plus élevée quand le milieu est moins aéré. Les résultats obtenus sont irréguliers quand les cultures sont faites en tubes ; au contraire, dans des fioles d'Erlenmeyer, on obtient pour des concentrations comprises entre 0,5 et

1,2 γ pour 100 cm^3 une régularité très remarquable. Le développement est indépendant de la quantité de bactéries ensemencées comme l'ont également montré Lwoff et Querido. Dans une certaine limite, il ne dépend pas de la concentration en phosphate. Nous avons préféré utiliser un milieu renfermant 9 gr. de phosphate par litre, et notre courbe d'étalonnage est identique à celle de Lwoff et Querido établie pour 4,5 gr. de phosphate.

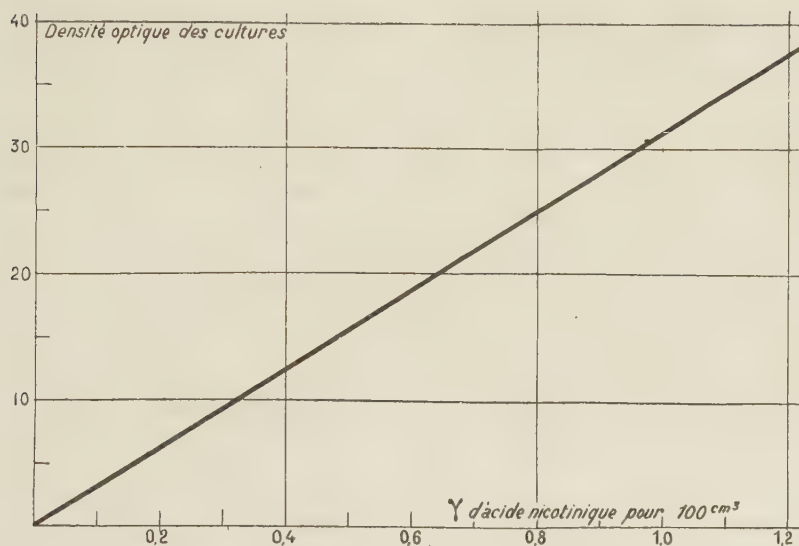


FIG. 1. — Développement de *Proteus vulgaris* en fonction de la concentration en vitamine P. P. du milieu de culture (d'après Lwoff et Querido).

La densité optique est exprimée en graduation de l'électrophotomètre de Meunier (ancien modèle).

Les différents étalonnages donnent des courbes rigoureusement superposables ; il est, par conséquent, inutile de faire chaque fois un contrôle avec une quantité donnée de nicotinamide. Le *Proteus* est le seul organisme connu qui se comporte de cette façon vis-à-vis de la vitamine P. P. Nous verrons, par exemple, que pour *Shigella dysenteriae* il est nécessaire de vérifier l'étalonnage à chaque dosage.

Il est donc possible d'utiliser le test *Proteus* pour doser l'amide de l'acide nicotinique. Le développement de cette bactérie n'est pas lié strictement à cette amide : *Proteus* peut utiliser au même titre l'acide nicotinique, et, avec un rendement beaucoup plus faible, un certain nombre de dérivés de la pyridine. La spécificité de cette méthode sera discutée dans un des chapitres suivants.

ERREUR ET SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

Les erreurs qui interviennent dans un dosage peuvent être d'origine diverse : en premier lieu, il faut envisager celle qui est faite dans la mesure de la densité optique d'une culture. Dans l'électrophotomètre de Meunier du type actuel, l'erreur de lecture maxima est de 1/2 division du tambour. Si donc les erreurs commises sur la densité optique du milieu non ensemencé, du témoin et de la culture s'ajoutent, l'erreur absolue maxima est de 1,5 division de l'appareil. Toutes nos mesures sont effectuées avec des cultures dont la densité optique

Tableau I

RÉGULARITÉ DES RÉACTIONS QUANTITATIVES DE « PROTEUS VULGARIS »
POUR UN MÊME DOSAGE

Concentration en amide de l'acide nicotinique (en γ p. 100 cm^3)	0,15	0,20	0,50	0,80	1,0	2,0
Densité optique des cul- tures	3,3 3,8 2,2 3,3 3,1	6,6 7,9 8,0 7,3	18,8 17,8 18,0 17,3 18,1	26,8 28,2 27,2 27,0 27,0	32,5 32 33,9 32,2 34	61,7 60,4 61,0 60,8
Moyenne	3,1	7,5	18,0	27,2	32,9	61
Écart maximum de la moyenne	0,9	0,9	0,8	1,0	1,1	0,7
Erreur relative	28 0/0	12 0/0	4,5 0/0	3,6 0/0	3,3 0/0	1,2 0/0

D'après Lwoff et Querido (complété).

Pour chaque concentration, 50 cm^3 de milieu ont été préparés et répartis après ensemencement dans quatre ou cinq fioles d'Erlenmeyer. Les chiffres correspondent à la graduation du premier modèle de l'appareil de Meunier.

varie entre 40 et 80 divisions. Dans le cas le plus défavorable, l'erreur relative est donc au maximum de 3,7 0/0. Une erreur assez importante peut être due aux pipettes stérilisées à haute température ou à la nécessité de les manier stérilement. Il est bon en tout cas d'effectuer les dilutions avant stérilisation, c'est-à-dire avec le maximum de pré-

cision possible. Cependant, le milieu, à raison de 9 cm³ par Erlenmeyer est nécessairement mesuré avec des pipettes stériles de même que le liquide étudié.

Lwoff et Querido ont vérifié que dans le cas où les manipulations stériles sont réduites au minimum, les variations observées étaient réellement très faibles. Ces auteurs ont opéré ainsi : pour différentes concentrations de facteur de croissance, 50 cm³ de milieu ont été préparés et répartis après ensemencement dans 4 ou 5 fioles d'Erlenmeyer à raison de 10 cm³ par fiole. Le tableau I donne les résultats obtenus. On constate que dans la région où nous travaillons, l'écart maximum observé est de 4 divisions pour une culture de densité optique 66, ce qui correspond à une erreur relative de 6 o/o.

Par ailleurs, nous avons effectué l'expérience suivante : le milieu (contenant le citrate ferrique et le glucose) est réparti à raison de 9 cm³ par fiole d'Erlenmeyer ; 1 cm³ d'une solution contenant 0,12 γ de nicotinamide est ajouté ; les fioles sont ensuiteensemencées avec 11 gouttes de culture souche. 10 fioles identiques sont préparées ainsi. Les densités optiques propres des cultures sont les suivantes : 82,5 ; 76,5 ; 79 ; 76 ; 78,5 ; 79 ; 79 ; 77 ; 78 ; 79,5 ; la moyenne est de 78 l'écart maximum de la moyenne étant de 4,5, ce qui correspond à une erreur relative de 5,1 o/o. On peut donc admettre que l'erreur relative maxima de la méthode utilisée est dans tous les cas inférieure à 10 o/o. Il est possible, dans les meilleures conditions, de doser 0,06 γ de vitamine P. P. en solution dans 1 cm³ de liquide et de déceler par le test *Proteus* jusqu'à 0,01 γ d'acide nicotinique.

Toutes les expériences décrites dans ce travail, sauf indication contraire, ont été réalisées dans les conditions de la méthode de dosage que nous venons d'indiquer.

CHAPITRE II

CONDITIONS DE LA STABILITÉ DES RÉACTIONS QUANTITATIVES DE PROTEUS VULGARIS A LA VITAMINE P. P.

Constance des résultats obtenus. — Depuis que Lwoff et Querido ont établi en 1939 une méthode de dosage de la vitamine P. P. fondée sur le développement de *Proteus vulgaris*, de nombreuses mesures ont été faites au laboratoire de Physiologie Microbienne de l'Institut Pasteur avec la même souche X₁₉ Syrie. Il est très intéressant de constater que chaque vérification effectuée en présence d'une quantité déterminée de nicotinamide a donné les mêmes résultats que ceux obtenus par Lwoff et Querido en 1938-1939.

Tableau II

CONSTANCE DANS LE TEMPS DU DÉVELOPPEMENT DE « PROTEUS VULGARIS »
EN FONCTION DE LA NICOTINAMIDE

Dates des dosages	Densité optique des cultures (1)	Temps pendant lequel la souche a été entretenue en milieu synthétique
1938 et 1939 (Lwoff et Querido).	66	1 à 12 mois
Souche A : juin 1941.....	64	2 mois 1/2
novembre 1941.....	67,2	7 mois
novembre 1942.....	65	19 mois
Souche B : janvier 1943.....	68	6 jours

Les expériences ont toutes été réalisées avec la souche « X₁₉ Syrie » de la collection de l'Institut Pasteur.

La souche A a été prise à la collection le 12 avril 1941 et entretenue en milieu synthétique à 28°.

La souche B a été prise à la collection le 10 janvier 1943 et entretenue dans les mêmes conditions.

(1) Cultures effectuées en présence d'une concentration de 1 γ de nicotinamide pour 100 cm³ de milieu de culture.

Le tableau II montre : 1° Qu'une souche entretenue en milieu synthétique dans les conditions que nous avons indiquées pendant 6 jours ou pendant 19 mois donne exactement la même densité optique pour une concentration donnée de vitamine P. P. dans le milieu de culture.

2° Que par ailleurs, la souche entretenue à la collection de l'Institut Pasteur est parfaitement stable. Elle a, en janvier 1943, donné les mêmes chiffres que ceux obtenus par Lwoff et Querido en 1938.

Etude de la souche « P ». — Ces conclusions ne sont valables que pour des souches entretenues en milieu synthétique à 28° et repiquées régulièrement. Nous avons eu, en effet, l'occasion de constater que des modifications quantitatives importantes pouvaient survenir. En 1941, nous avons donné notre souche à un laboratoire de l'Institut Pasteur où elle a été entretenue à 37°, dans un milieu synthétique ne différant du nôtre que par la concentration en phosphate (13 gr. pour 1 000), avec tous les mois un passage sur gélose. Cette souche a été reprise par nous en novembre 1942 et a montré un comportement différent de la souche habituelle qui sera appelée « N », la souche modifiée sera étudiée sous le nom de souche « P ». La moyenne des densités optiques obtenues avec cette souche « P » dans 13 déterminations, effectuées en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³ de milieu, est de 43,2 : l'écart maximum de la moyenne observé étant de 3,2 divisions. La souche entretenue à 28° ou à la collection de l'Institut Pasteur (souche N) donne une densité optique de 66. On voit que pour une quantité déterminée de vitamine P. P., le développement de la souche P est de 34 o/o inférieur à celui de la souche initiale N. Toutes nos mesures ont été effectuées à 28°. La souche P entretenue de nouveau à cette température pendant 9 mois en milieu synthétique ou en bouillon a donné exactement les mêmes chiffres qu'après 2 jours de séjour à 28°. La variation observée semble donc parfaitement stable et irréversible. Après un séjour de 10 mois à 28° en bouillon peptoné, nous n'avons pu observer non plus aucun changement de comportement.

On aurait pu penser que cette différence pouvait tenir à une assimilation inégale de l'acide et de l'amide nicotinique. Mais la souche P donne le même développement en présence de quantités équimoléculaires d'acide et d'amide nicotinique. Elle se comporte donc de ce point de vue comme la souche N. Par ailleurs, le développement de la souche P en fonction d'une quantité donnée de coenzyme I est inférieur de 34 o/o à celui de la souche N. Le comportement relatif des deux souches N et P vis-à-vis de l'acide et de l'amide nicotinique et du coenzyme I est identique. Nous avons vérifié aussi que la souche P présentait le même comportement à pH 6,9 et à pH 7,3. Enfin, les expériences font ressortir qu'avec la souche P comme avec la souche N

le développement bactérien est proportionnel à la concentration du milieu en vitamine P. P.

*
* *

L'étude de la souche N qui a maintenant été suivie pendant 5 ans montre que le besoin en acide nicotinique d'une souche de *Proteus* peut se maintenir constant. Mais cette constance ne subsiste que dans certaines conditions : les repiquages étant effectués à intervalles réguliers, assez rapprochés et la culture étant entretenue à une température de 28°. Le résultat est le même que le milieu soit constitué par une solution saline glucosée et additionnée d'acide nicotinique ou par du bouillon. Par contre, si la souche est entretenue à 37°, on peut observer une augmentation importante du besoin en nicotinamide.

Nous avons alors essayé de reproduire la transformation $N \rightarrow P$. Une souche de *Proteus* « X₁₀ » Syrie, entretenue en milieu synthétique à 28° pendant 7 jours et qui était de comportement N a été mise à 38°. Les repiquages ont été effectués régulièrement tous les jours ou tous les deux jours en milieu synthétique en présence d'un excès d'acide nicotinique. Après 10 jours de séjour à 38°, cette souche est repiquée dans un milieu pauvre en acide nicotinique et entretenue à 28°. Quand l'excès d'acide nicotinique du milieu est éliminé, c'est-à-dire après 4 jours, on constate que le développement de cette souche N₁ en présence d'une quantité donnée de nicotinamide est de 22 o/o inférieur à celui de la souche N. Pour la souche N₁, le rendement de la croissance en fonction de la nicotinamide est donc intermédiaire entre celui des souches N et P. Mais la souche N₁ n'est pas stable; en effet, nous avons continué à l'entretenir à 28°, et nous avons constaté que 8 jours plus tard, c'est-à-dire après 12 jours de séjour à 28°, ses réactions quantitatives étaient de nouveau identiques à celles de la souche normale N.

Après 5 mois 1/2 d'entretien de la souche N en milieu synthétique à 38°, nous avons étudié de nouveau son comportement; nous désignerons cette souche par N₂. Après 4 jours d'entretien à 28°, les réactions de la souche N₂ à la nicotinamide sont identiques à celles de la souche P. Cette souche N₂ comme la souche P est stable.

Trois hypothèses peuvent être envisagées au sujet de la nature de la transformation $N \rightarrow P$:

1° la souche normale N est impure et serait constituée par un mélange de bactéries N et P, ces dernières se trouvant en proportion très faible,

2° la transformation $N \rightarrow P$ est une mutation. Dans un cas comme dans l'autre, il faut admettre que la température de 37° favorise la forme P aux dépens de la forme N qui est ainsi éliminée. Les expé-

riences réalisées avec la souche N₁ semblent bien montrer que la température de 37° élimine la souche N. On peut supposer en effet que la souche N₁ était un mélange des deux formes N et P ; à 28°, la forme N persiste seule alors qu'à 37° la forme N a été éliminée et on a en définitive obtenu la forme P à l'état pur,

3° à la température de 37°, il se produirait lentement une altération enzymatique chez toutes les bactéries N.

De toute façon, la transformation N → P est irréversible.

Il faut noter que nous avons obtenu aussi une variation du besoin en nicotinamide avec une souche de *Proteus vulgaris* entretenue à 28° en milieu synthétique de façon très irrégulière (souche D) ; en particulier, en dernier lieu la souche n'avait pas été repiquée pendant 3 mois. Le rendement de la croissance de cette souche était assez irrégulier et en tout cas inférieur à celui de la souche P. Pour la souche D, la proportionnalité entre le développement et la concentration en facteurs de croissance du milieu de culture n'est pas toujours respectée, ce qui peut faire penser que cette modification est de nature différente de la modification P. Il est en tout cas essentiel de savoir que des changements notables dans le besoin en vitamine d'une bactérie peuvent se produire si les conditions de culture sont modifiées, et que ces changements peuvent être stables. C'est à notre connaissance la première fois que l'on signale une augmentation « héréditaire » du besoin d'un organisme pour une vitamine.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE DIVERSES SUBSTANCES SUR LE DÉVELOPPEMENT DES SOUCHES N ET P DE *PROTEUS VULGARIS* EN FONCTION DE LA NICOTINAMIDE

Il était intéressant de savoir, tant au point de vue théorique qu'au point de vue de la technique du dosage, si le développement de *Proteus vulgaris* en fonction de la nicotinamide, c'est-à-dire en fait le besoin en vitamine P. P. de la bactérie, pouvait être modifié par l'addition de différentes substances au milieu de culture et en particulier par les constituants tissulaires.

Nous avons étudié successivement : l'action de certaines vitamines, du sérum normal ou hydrolysé, de quelques acides aminés isolés ou en mélanges. Enfin, il nous a semblé utile de vérifier les conclusions de Möller relatives au rôle favorable des nitrates sur le rendement de la croissance de *Proteus vulgaris* en fonction de la nicotinamide.

Ces recherches ont porté sur les deux souches N et P qui ont été définies précédemment. Rappelons qu'elles se distinguent essentiellement par les différences quantitatives de leurs réactions à la nicotinamide ; on verra qu'elles diffèrent aussi par leur comportement vis-à-vis de diverses substances favorisantes.

ÉTUDE DE LA SOUCHE N

Action de diverses vitamines. — Nous avons ajouté au milieu de culture habituel : de la vitamine B₁ (à la concentration de 1×10^{-7}), de l'acide *p*-aminobenzoïque (à la concentration de 1×10^{-5}), et de l'acide pantothénique (à la concentration de 1×10^{-5}). Le développement a été identique dans le milieu témoin et dans le milieu additionné

de ces substances qui sont donc dépourvues d'action sur le rendement de la croissance en fonction de la nicotinamide.

Action du sérum. — En 1939, Lwoff, Querido et Lataste avaient constaté que le sérum humain n'avait aucune influence sur la croissance de leur souche de *Proteus vulgaris*. Nous avons repris ces expériences sur la souche N : a) avec du sérum de cheval frais; b) avec du sérum ayant subi une hydrolyse acide (20 cm³ de sérum frais sont additionnés de 60 cm³ d'HCl pur, chauffés 3 heures à 130°; l'hydrolysate est ensuite neutralisé et stérilisé). Nous n'avons pu observer aucune augmentation significative de la croissance en fonction de la nicotinamide, quelle que soit la concentration de sérum ou d'hydrolysate utilisée. Le sérum — frais ou hydrolysé — à une concentration supérieure à 100 exerce une action inhibitrice plus ou moins marquée, à plus faible concentration il est sans action.

Action des acides aminés. — Le sérum apporte au milieu de culture la plupart des acides aminés connus. Il était donc curieux qu'il soit sans action sur le développement microbien. En effet, Möller et Birkofer ont observé une action des acides aminés sur la croissance de *Proteus vulgaris*, cette action est de deux ordres :

1° dans un milieu renfermant de nombreux acides aminés, dont la constitution est la suivante :

Citrate ferrique.	$0,84 \times 10^{-5}$
Chlorure de manganèse (+ 4H ₂ O).	$0,25 \times 10^{-5}$
Sulfate de magnésium (+ 7H ₂ O).	$0,84 \times 10^{-4}$
Sulfate d'ammonium	$0,75 \times 10^{-3}$
Phosphate monopotassique Sörensen.	$0,45 \times 10^{-2}$
Chlorure de potassium	$0,5 \times 10^{-2}$
Nitrate de potassium.	$2,0 \times 10^{-2}$
Glucose	$2,0 \times 10^{-2}$
Chlorhydrate de l-cystéine	$4,2 \times 10^{-5}$
d-l-méthionine.	$0,5 \times 10^{-4}$
Glycocolle	$0,5 \times 10^{-4}$
d-l-alanine	$0,5 \times 10^{-3}$
d-l-valine	$1,0 \times 10^{-4}$
d-l-leucine	$1,0 \times 10^{-4}$
d-l-isoleucine	$1,0 \times 10^{-4}$
Nitrate de l-arginine	$0,5 \times 10^{-4}$
d-l-phénylalanine	$1,0 \times 10^{-4}$
l-tryptophane	$0,5 \times 10^{-4}$
Acide d-l-aspartique	$0,5 \times 10^{-4}$
Acide l-glutamique	$0,5 \times 10^{-3}$

la croissance de *Proteus vulgaris* est, d'après Möller et Birkofer, plus rapide. En présence d'un excès de nicotinamide, le développement maximum est plus élevé que dans un milieu non additionné d'acides aminés. L'augmentation peut atteindre 50 o/o si le milieu contient du nitrate de potassium.

2° en présence d'une concentration en nicotinamide limitant le développement, le mélange d'acides aminés augmente la quantité de germes. Les acides pantothénique et *p*-aminobenzoïque n'ont pas d'action. Möller et Birkofer effectuent leurs cultures dans des tubes contenant 6 cm³ de milieu. En l'absence de nitrate les cultures sont peu abondantes et les résultats souvent irréguliers. Par addition de 0,1 o/o de NO₃K au milieu, en présence de glucose, on observe, pour une même quantité d'acide nicotinique, une amélioration des cultures de 50 o/o. La question de l'action du nitrate sera discutée plus loin.

Examinons maintenant l'action des acides aminés sur la croissance de *Proteus vulgaris* en fonction de la concentration en acide nicotinique du milieu de culture.

Nous avons voulu effectuer une étude comparative précise de l'influence des acides aminés sur le développement de la souche N en présence d'une même quantité d'acide nicotinique limitant le développement dans le milieu de Lwoff et Querido d'une part, et dans celui de Möller et Birkofer d'autre part. Nous avons observé dans les fioles témoins ensemencées, non additionnées d'acide nicotinique et qui présentent un très faible développement bactérien, une coloration du milieu de culture, qui se produit pendant l'incubation de 36 heures à 28°. Cette coloration se manifeste uniquement en présence des bactéries, les témoins non ensemencés restent incolores. Pour des cultures très denses on observe une coloration jaunâtre que n'ont pas les suspensions de *Proteus vulgaris* cultivées en l'absence d'acides aminés ; mais ceci peut passer inaperçu pour un observateur non prévenu. La présence de ce pigment rend difficile les mesures photométriques. Nous avons alors constaté :

1° qu'il suffit d'ajouter du tryptophane au milieu de culture pour voir se développer une coloration analogue à celle donnée par le mélange d'acides aminés ;

2° qu'en présence du mélange d'acides aminés de Möller et Birkofer dépourvu de tryptophane il ne se développait plus aucune coloration. Nous avons donc employé ce mélange d'acides aminés exempt de tryptophane. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-contre. On voit que le pourcentage d'augmentation observé en présence du mélange d'acides aminés varie de façon notable d'une expérience à l'autre. Quoi qu'il en soit, les acides aminés à la concentration utilisée ont une action indiscutable sur la croissance de la souche N, tandis que le sérum hydrolysé qui contient tous ces acides aminés est dépourvu d'activité. Pour une concentration du mélange d'acides

aminés de 20 o/o et 10 o/o dans le milieu de culture, le pourcentage d'augmentation du développement bactérien pour une quantité donnée de nicotinamide est sensiblement le même, soit 55 o/o; pour une concentration de 2 o/o l'effet observé est très faible, et pour une concentration de 1 o/o il n'y a plus aucune action. La concentration

Tableau III

ACTION D'UN MÉLANGE D'ACIDES AMINÉS (1) SUR LE DÉVELOPPEMENT
DE LA SOUCHE N

Densité optique des cultures (2) effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido additionné de :		o/o d'augmentation
O	acides aminés	
66	90	+ 36 o/o
64	81	+ 26 o/o
67	106	+ 57 o/o

(1) Il s'agit du mélange de Möller et Birkofer exempt de tryptophane.

(2) Cultures effectuées dans un milieu contenant 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³.

Tableau IV

CONCENTRATION COMPARÉE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS DANS LE MILIEU DE
CULTURE APRÈS ADDITION DE SÉRUM OU DU MÉLANGE DE MÖLLER ET BIRKOFER

	Milieu contenant :	
	1 pour 7.000 de sérum hydrolysé (1)	10 o/o du mélange d'acides aminés
Alanine	$7,0 \times 10^{-7}$	$0,25 \times 10^{-3}$
Glycocolle	$5,0 \times 10^{-8}$	$0,25 \times 10^{-3}$
Leucine + isoleucine....	$5,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
Acide aspartique	$8,0 \times 10^{-6}$	$0,25 \times 10^{-3}$

(1) La teneur en acides aminés est calculée d'après les chiffres donnés par Lloyd et Shore.

des différents acides aminés apportés au milieu de culture par le mélange de Möller et Birkofer est très supérieure à celle qui peut être réalisée par addition de sérum hydrolysé à 1 pour 7 000, comme le montre le tableau ci-contre. Pour que le sérum hydrolysé apporte des acides aminés à une concentration suffisante, il faudrait l'utiliser à des

concentrations qui se sont révélées toxiques; ceci peut expliquer que le sérum n'améliore pas le rendement de la croissance de la souche N en fonction de la nicotinamide.

Nous avons alors essayé systématiquement des solutions d'acides aminés isolés. Nous avons constaté que :

a) en présence de tryptophane et de lysine, il se développe dans les cultures de *Proteus vulgaris* un pigment qui empêche les mesures photométriques. Ces deux acides aminés ne peuvent donc être étudiés dans les conditions où nous avons opéré ;

b) nous avons essayé isolément : glycolle, alanine, valine, leucine, isoleucine, acide glutamique, acide aspartique, phényl-alanine, méthionine, arginine, tyrosine, à la concentration de 1 pour 2 000 dans le milieu de culture, la cystéine à une concentration de 1 pour 2 000 et de 1 pour 20 000 et le glutathion à la concentration de 1×10^{-3} sans observer d'augmentation de la croissance de *Proteus vulgaris* en fonction de la nicotinamide supérieure aux erreurs d'expérience. Nous avons toujours utilisé les isomères naturels (l.) ou à défaut les acides racémiques.

Action des nitrates. — Quastel et Wooldridge (1925), puis Braun et Vasárhelyi (1932) ont montré que *Proteus vulgaris* peut activer les nitrates comme accepteurs d'hydrogène. Nous avons confirmé ces résultats (1941) et montré que l'addition de NO_3K au milieu de culture permet à la bactérie d'utiliser en anaérobiose des aliments carbonés qui, en l'absence d'oxygène, ne permettent pas le développement. Tel est le cas des acides pyruvique, lactique et succinique — incapables

Tableau V

ACTION DU NITRATE DE POTASSIUM SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE N

	Densité optique des cultures (1) effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido additionné de :		0/0 d'augmentation
	O	0,1 0/0 NO_3K	
	62	81	30 0/0
	66,5	90	36 »
	64	85	33 »
	61	88	44 »
	67	83	24 »
Moyenne	63	86	33 0/0

(1) Cultures effectuées en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm^3 de milieu.

Tableau VI

INFLUENCE DE CONCENTRATIONS VARIABLES DE NO_3K
SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE N

Nitrate de potassium				
0	0,2 0/0	0,4 0/0	0,01 0/0	0,001 0/0
62 66,5 61	70	81 90 88	84 67	68

Les chiffres représentent la d. o. des cultures effectuées en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm^3 de milieu de Lwoff et Querido.

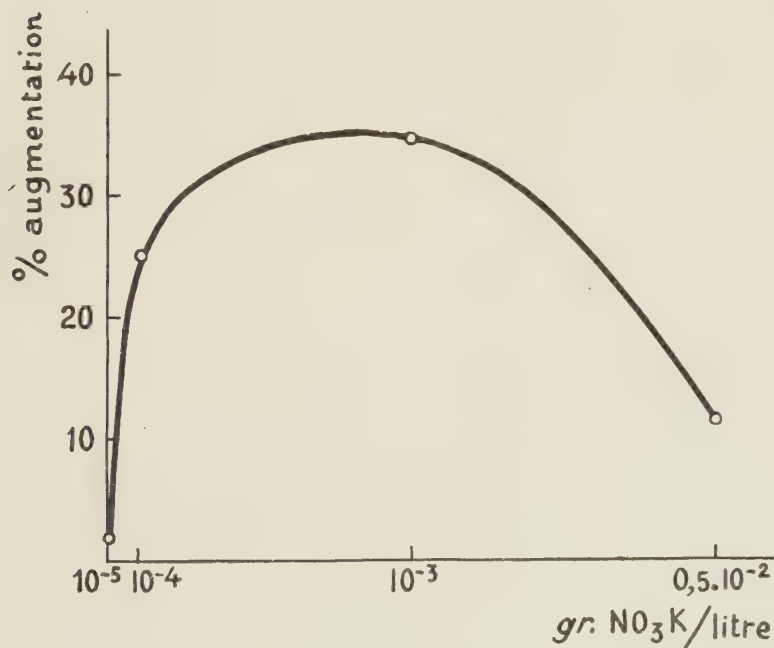


FIG. 2. — Influence de la concentration en nitrate sur le développement de *Proteus* en présence d'une quantité donnée de nicotinamide.

La courbe représente le pourcentage de l'augmentation du développement d'une culture en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm^3 de milieu en fonction de quantités variables de nitrate.

d'assurer la nutrition carbonée en l'absence d'un accepteur d'hydrogène — qui permettent une croissance normale dans des milieux oxygénés ou dans des milieux non aérés additionnés de nitrate. Le glucose

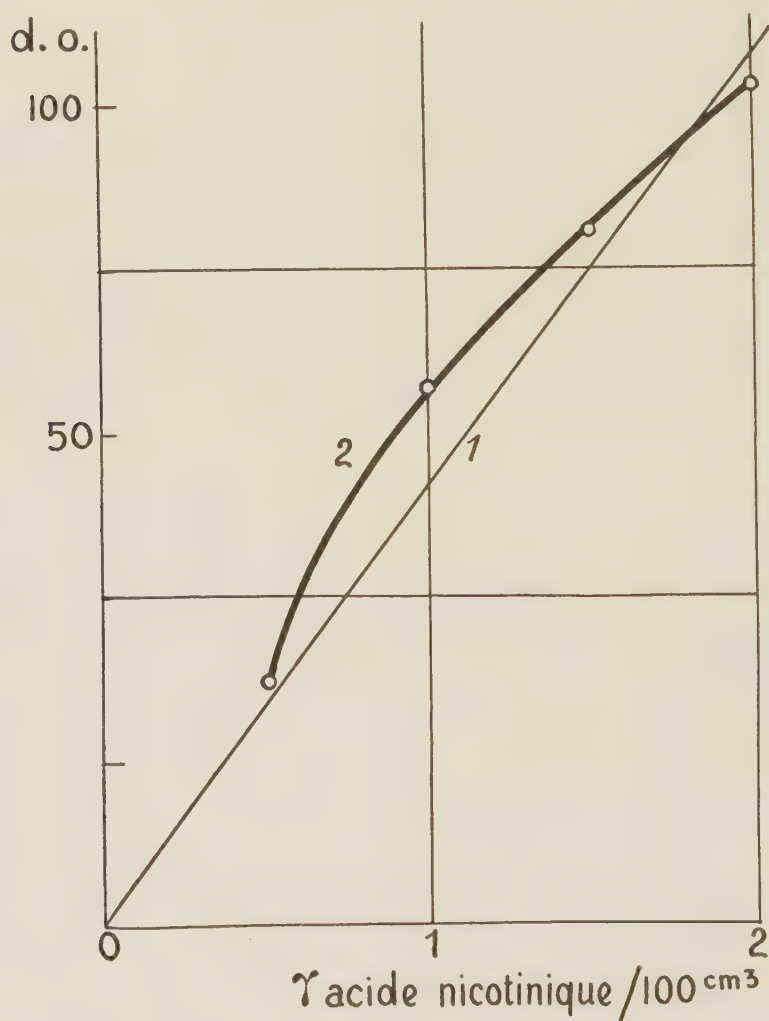


FIG. 3. — Influence des nitrates sur la croissance en fonction de la nicotinamide.

1. Témoin sans nitrate.

2. Culture effectuée en présence de 0,1 o/o de NO₃K.

au contraire permet un développement anaérobie dans un milieu ne contenant pas de nitrate. Nous avons ajouté au milieu de culture du nitrate de potassium et nous avons constaté qu'à une concentration de 0,1 o/o il augmente la croissance bactérienne de 36 o/o environ

pour une moyenne de 5 expériences. Le tableau V montre que le pourcentage d'augmentation est assez variable dans les diverses expériences, allant de 23 o/o à 44 o/o.

Nous avons ensuite déterminé :

a) en présence d'une quantité fixe de nicotinamide (1 γ pour 100 cm³ de milieu) quelle était la concentration optima de NO₃K. Avec 0,01 o/o de NO₃K on observe encore une certaine amélioration, avec 0,001 o/o il n'y a plus aucune action (tableau VI et figure 2).

b) en présence de la quantité optima de nitrate (0,1 o/o) nous avons suivi le développement des cultures en fonction de concentrations variables de nicotinamide (fig. 3). Nous voyons que la courbe d'étalonnage n'est plus une droite passant par l'origine comme dans le milieu utilisé

Tableau VII

FORMATION DES NITRITES PAR LA SOUCHE N

d. o. des cultures	pour 100 cm ³ de milieu de culture					0/0 de NO ₃ retrouvé sous forme de NO ₂
	γ d'acide nicotinique	NO ₃ K initial		NO ₂ Na trouvé		
		en mgr.	mol.-gramme	en mgr.	mol.-gramme	
88	I	100		20,4		
23,5	0,5	100		0,92		
83,5	I	»		26,8	0,39 × 10 ⁻³	
103,5	I,5	»		41,2		
114	2	»		44,8		
75	I	20	1,98 × 10 ⁻⁴	9,8	1,4 × 10 ⁻⁴	75 o/o
67	I	10	0,99 × 10 ⁻⁴	5,5	0,79 × 10 ⁻⁴	71 »
37,5	0,5	10	0,99 × 10 ⁻⁴	2,47	0,36 × 10 ⁻⁴	36 »
85	I	»		4,6	0,66 × 10 ⁻⁴	68 »
105,5	I,5	»		3,58	0,51 × 10 ⁻⁴	51 »
128	2	»		2,29	0,32 × 10 ⁻⁴	32 »

par Lwoff et Querido, mais présente une courbure très nette et ne passe plus par le zéro. En présence de nitrate, la densité optique des cultures n'est plus proportionnelle à la concentration en nicotinamide du milieu ; elle n'est supérieure à celle obtenue dans le milieu synthétique simple que dans une région assez étroite. Pour de faibles quantités de nicotinamide le développement bactérien est légèrement plus faible ; pour de fortes quantités (2 γ pour 100 cm³ de milieu) aussi (v. fig. 3).

Le milieu de culture utilisé renferme un excès considérable de sulfate d'ammonium. Il était donc *a priori* probable que le nitrate ajouté n'était pas utilisé comme aliment azoté. En fait, nous avons constaté que le NO_3K est incapable de satisfaire les besoins en azote de *Proteus vulgaris*. Dans le milieu de Lwoff et Querido, dans lequel le sulfate d'ammonium est remplacé par du NO_3K , il n'y a aucun développement. On peut en conclure que *Proteus vulgaris* est incapable de réduire les nitrates en NH_4 . Cependant, l'action des nitrates permettait de penser qu'ils devaient subir une modification quelconque qui pouvait être une réduction en nitrites. Nous avons donc dosé les nitrites dans le milieu additionné de nitrate de potassium. Nous avons utilisé la réaction colorée de Griess, obtenue en faisant agir en milieu acétique les nitrites sur l'acide sulfanilique et sur la β -naphtylamine. Nous avons trouvé ainsi dans le milieu de culture des quantités notables de nitrites (voir le tableau ci-contre).

a) Pour des cultures effectuées en présence d'une quantité limitante de NO_3K (0,01 o/o) dans un milieu contenant 1 γ d'amide nicotinique pour 100 cm^3 , on retrouve 5 mgr. de nitrites pour 100 cm^3 de milieu, soit 70 o/o de l'azote nitrique sous forme d'azote nitreux. La transformation n'est pas complète, cependant ceci n'est pas dû à la toxicité des nitrites. En effet :

1° En présence d'un excès de nitrate, la quantité de nitrite formée est plus forte : on retrouve environ 20 mgr. de NO_2Na pour 100 cm^3 de milieu.

2° A raison de 0,005 o/o les nitrites ne manifestent aucune toxicité pour *Proteus vulgaris* ; ils n'exercent une action inhibitrice nette sur sa croissance qu'à partir d'une concentration de 0,02 o/o.

b) En présence d'un excès de nitrate (0,1 o/o) la quantité de nitrite formée est proportionnelle à la quantité de bactéries présentes.

Remarque sur la nutrition azotée de Proteus vulgaris. — L'aliment azoté fourni à *Proteus vulgaris* doit obligatoirement être transformé en NH_2 pour la synthèse des acides aminés. Cette transformation ne peut être effectuée par *Proteus vulgaris* aux dépens des nitrates qui sont cependant réduits en nitrites. L'absence d'utilisation des nitrites comme aliment azoté tient vraisemblablement à l'incapacité où se trouve la bactérie de réduire les nitrites.

Action du fumarate. — La présence dans le milieu de culture de nitrate de potassium qui joue le rôle d'accepteur d'hydrogène augmente le développement bactérien correspondant à une quantité donnée de nicotinamide. On pouvait se demander si d'autres accepteurs d'hydrogène auraient la même action. Quastel et Wooldridge (1925), puis Braun et Vasárhelyi (1932) ont montré que le *Proteus* pouvait activer légèrement le fumarate comme accepteur d'hydrogène. Nous avons

donc essayé d'ajouter du fumarate à notre milieu de culture. Le tableau ci-contre montre que les résultats obtenus sont identiques en présence de fumarate (0,1 0/0) ou de nitrate de potassium (0,1 0/0).

Action du mélange : acides aminés + nitrates. — Les actions des acides aminés et des nitrates ne s'additionnent pas comme on aurait pu le supposer (tableau VIII). Il se forme cependant plus de nitrites en présence des acides aminés.

Tableau VIII

ACTION DU MÉLANGE : ACIDES AMINÉS (I) + NITRATES
SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE N

+ O	NO ₃ K 0,1 0/0		Acides aminés		NO ₃ K 0,1 0/0 + acides aminés	
d. o.	d. o.	augmen- tation	d. o.	augmen- tation	d. o.	augmen- tation
64 62	85 83	32 0/0 36 »	81 106,5	26 0/0 70 »	76,5 98,5	19 0/0 56 »

Les chiffres représentent la d. o. de cultures effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido, en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³.

(1) Mélange de Möller et Birkofer exempt de tryptophane.

On voit par l'examen du tableau VIII que le pourcentage d'augmentation de la croissance en présence d'acides aminés et de nitrate est toujours inférieur à celui obtenu en présence d'acides aminés seulement.

ÉTUDE DE LA SOUCHE P

Il nous a paru intéressant de rechercher comment la souche P de *Proteus vulgaris*, laquelle, nous l'avons montré, a besoin de 50 0/0 de plus de nicotinamide que la souche N, se comportait vis-à-vis des différentes substances dont nous venons d'examiner l'action.

Action du sérum. — A l'encontre de la souche N, la souche P est très sensible à l'action du sérum. La densité optique finale est augmentée : de 28 0/0 par addition de 1 0/0 de sérum frais ; de 34 0/0 par addition de 1 0/0 d'hydrolysate acide. La concentration d'hydrolysate donnant une augmentation maxima en présence d'une quantité déterminée d'acide nicotinique est de 0,5 0/0, ce qui correspond à

une dilution de sérum hydrolysé de 1 pour 7 000. Dans ces conditions on voit que le développement obtenu avec cette souche P en présence de sérum est sensiblement le même que celui obtenu avec la souche normale N sans sérum. Les concentrations d'hydrolysats supérieures à 1 o/o sont nettement toxiques, fait déjà noté à propos de la souche N.

Notons que la souche D se comporte vis-à-vis du sérum hydrolysé exactement comme la souche P.

Action des acides aminés. — L'augmentation moyenne due à la présence dans le milieu du mélange d'acides aminés de Möller et Birkofer exempt de tryptophane est de 65 o/o pour trois expériences.

Tableau IX

ACTION DU MÉLANGE D'ACIDES AMINÉS (1) SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE P

+ O	+ acides aminés	Augmentation
40	65,5	62 o/o
44,5	72,5	62 »
42,5	73	72 »
Moyenne.....		65 o/o

Les chiffres représentent la d. o. de cultures effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido, en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³.

(1) Mélange de Möller et Birkofer exempt de tryptophane.

Par ailleurs, le tableau X donne les résultats obtenus pour la souche P avec des acides aminés isolés. On observe une amélioration de la croissance avec l'isoleucine et l'acide aspartique à la concentration de 1 pour 2 000 ; l'isoleucine est nettement plus active que l'acide aspartique. Toutefois, l'augmentation du développement est plus faible avec les aminoacides isolés qu'avec le mélange d'acides aminés étudié plus haut. Notons qu'il faut une concentration assez forte de ces acides aminés pour obtenir une action. Le mélange isoleucine + acide aspartique n'est pas plus actif que l'isoleucine seule.

G. P. Gladstone a montré que l'isoleucine exerçait une action inhibitrice sur le développement de *Bacillus anthracis*. Cette action est supprimée par l'addition de valine et de leucine. Nous avons constaté que le mélange équilibré de Gladstone : isoleucine + valine + leucine avait une action légèrement inférieure à celle de l'isoleucine seule sur le développement de la souche P de *Proteus vulgaris*.

Tableau X

ACTION DE DIVERS ACIDES AMINÉS SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE P

	Concentration d'acide aminé utilisé	Action sur le développement (1)
Glycocolle	1 pour 2.000	+ 4 0/0
d-l-alanine	»	+ 7 0/0
d-l-valine	»	+ 6 0/0
d-l-leucine	»	+ 3 0/0
d-isoleucine	1 pour 2.000	+ 34 0/0 (2)
d-acide glutamique	1 pour 20.000	0
d-l-acide aspartique	1 pour 2.000	+ 0,5 0/0
d-l-phénylalanine	»	+ 23 0/0 (2)
d-l-méthionine	1 pour 10.000	+ 3 0/0
d-l-arginine	1 pour 2.000	+ 3 0/0
l-tyrosine	»	0
l-cystéine	1 pour 20.000	— 5 0/0
	1 pour 2.000	— 5 0/0
	1 pour 20.000	— 3 0/0

(1) Pourcentage d'augmentation de la d. o. des cultures obtenues en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³ dans le milieu de Lwoff et Querido additionné des acides aminés indiqués, et de celle obtenue dans le milieu synthétique simple.

(2) Moyenne de trois expériences.

Action des nitrates et du fumarate. — La présence de nitrate n'augmente que très peu le développement de la souche P pour une quantité donnée de nicotinamide. Le tableau ci-contre indique des différences faibles et variables d'une expérience à l'autre. Mais comme

Tableau XI

ACTION DU NITRATE DE POTASSIUM SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE P

+ O	+0,1 0/0 NO ₃ K	Augmentation (1)
40	44,5	10 0/0
40,5	47,5	17 »
44,5	52,5	17 »
40	46	12 0/0

Les chiffres représentent la d. o. de cultures effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido, en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³.

(1) 0/0 d'augmentation de la d. o. des cultures effectuées en présence de NO₃K par rapport à celle des cultures effectuées dans le milieu synthétique simple.

ces différences sont toujours dans le même sens, on peut cependant conclure à une légère augmentation du rendement des cultures en fonction de la nicotinamide due à la présence de nitrates. La concentration de nitrate la plus favorable semble être 0,1 o/o comme pour la souche N. La quantité de nitrites formés dans le milieu de culture est la même avec les souches N et P pour une quantité donnée d'acide nicotinique, quoique l'action sur la croissance soit très différente.

Le fumarate a exactement la même action que les nitrates sur le développement de la souche P.

Action du mélange : acides aminés + nitrates. — Les deux actions ne s'ajoutent pas. Le pourcentage d'augmentation observé est sensiblement le même que celui correspondant au mélange d'acides aminés sans nitrate.

Tableau XII

ACTION DU MÉLANGE ACIDES AMINÉS (1) + NITRATE
SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA SOUCHE P

+ O	+ NO ₃ K 0,1 0/0		+ Acides aminés		+ NO ₃ K 0,1 0/0 + acides aminés	
d. o.	d. o.	augmen- tation (2)	d. o.	augmen- tation (2)	d. o.	augmen- tation (2)
40	44,5	11 0/0	65,5	63 0/0	66,5	65 0/0
44,5	52,5	18 »	72,5	62 »	78	76 »

Les chiffres représentent les d. o. des cultures effectuées dans le milieu de Lwoff et Querido en présence de 1 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³ de milieu.

(1) Mélange de Möller et Birkofer exempt de tryptophane.

(2) 0/0 d'augmentation de la d. o. observée pour les cultures effectuées en présence des substances indiquées par rapport à celle des cultures effectuées dans le milieu synthétique simple.

COMPARAISON DES RÉACTIONS DES SOUCHES N ET P AUX DIVERSES SUBSTANCES ÉTUDIÉES

D'après l'ensemble des données qui précèdent, nous voyons que les deux souches étudiées se comportent de façon assez différente. Nous pouvons résumer ainsi les résultats qui sont schématisés dans le tableau ci-contre.

1° Rappelons que le développement maximum obtenu en présence

Tableau XIII

COMPARAISON DES RÉACTIONS DES SOUCHES N ET P A DIVERSES SUBSTANCES

Milieu de Lwoff et Querido	Souche N	Souche P
+ hydrolysate de sérum (0,5 o/o).....	0	+ 34 o/o
+ mélange acides aminés (20 o/o).....	+ 39 o/o	+ 65 »
+ l-isoleucine	0	+ 34 »
+ acide aspartique-d-l	0	+ 23 »
+ NO ₃ K (0,1 o/o).....	+ 33 o/o	+ 12 »
+ NO ₃ K (0,1 o/o) + acides aminés (20 o/o).....	+ 37 »	+ 70 »

Les chiffres représentent le pourcentage d'augmentation de la d. o. des cultures, effectuées en présence de 1 γ de nicotinamide pour 100 cm³, obtenu par addition au milieu de Lwoff et Querido des substances indiquées dans la première colonne.

Rappelons que le développement maximum obtenu en présence de 1 γ de nicotinamide est de 66 divisions de notre électrophotomètre pour la souche N, de 42 divisions seulement pour la souche P (soit une diminution de 34 o/o).

de 1 γ de nicotinamide correspond à 66 divisions de l'électrophotomètre pour la souche N, à 43 divisions seulement pour la souche P, soit 34 o/o en moins.

2° Seule la souche P est sensible à l'action du sérum.

3° L'augmentation du développement bactérien, par addition au milieu de culture du mélange des 12 acides aminés en présence d'une quantité donnée de nicotinamide, est beaucoup plus forte pour la souche P que pour la souche N.

4° Aucun des acides aminés essayés n'influe, aux concentrations utilisées, sur le développement de la souche N, tandis que la souche P est sensible à l'isoleucine et à l'acide aspartique.

5° L'action des nitrates et du fumarate est beaucoup plus marquée sur la souche N que sur la souche P.

L'ensemble des résultats qui précèdent montre que la souche P ne se distingue pas seulement de la souche N par un besoin plus élevé en vitamine P. P., elle en diffère aussi par ses réactions quantitatives vis-à-vis du sérum, des acides aminés, des nitrates et du fumarate.

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

a) La modification N $\rightarrow$ P a porté à la fois sur le besoin en nicotinamide et sur l'ensemble des propriétés qui conditionnent la réaction au sérum, aux acides aminés et aux accepteurs d'hydrogène, nitrate et fumarate.

b) Le besoin accru en nicotinamide, et la réaction au sérum, aux acides aminés, aux nitrates et au fumarate, constituent des manifestations différentes d'un processus unique. Ce problème sera discuté dans le chapitre consacré aux relations qui existent entre le besoin de *Proteus vulgaris* en nicotinamide et son métabolisme.

Quoi qu'il en soit du mécanisme intime de ces phénomènes, un fait semble bien établi : une souche de *Proteus vulgaris* que nous appelons N a donné une variante P identique en apparence à la souche N mais qui en diffère cependant par son besoin en nicotinamide et par sa réaction à diverses substances.

Au point de vue pratique, nous pouvons conclure que :

1° les souches P et D qui sont sensibles à la présence de faibles quantités de sérum dans le milieu de culture sont inutilisables pour le dosage de la vitamine P. P. dans des liquides biologiques ;

2° la croissance de la souche N n'est pas influencée par la présence de sérum ; elle l'est toutefois par le mélange d'acides aminés. Ceux-ci se rencontrent dans les produits biologiques ; mais rappelons que les dilutions utilisées pour les dosages de vitamine P. P. sont toujours très grandes : le sang est ajouté au milieu à raison de 1 pour 700 à 1 pour 1 000, l'extrait de muscle à raison de 1 pour 5 000 et celui de foie à raison de 1 pour 20 000. Les quantités d'acides aminés apportées au milieu de culture par les solutions à doser sont donc trop faibles pour être actives vis-à-vis du *Proteus*.

La souche de *Proteus vulgaris* « X₁₉ Syrie » de la collection de l'Institut Pasteur peut donc être utilisée pour les dosages de vitamine P. P. dans les produits biologiques non déprotéinés, mais il est nécessaire que son entretien soit effectué dans des conditions très précises :

a) soit sur milieu gélosé peptoné, le repiquage étant effectué tous les mois. Le temps de séjour à 37° ne doit être que de 12 à 24 heures, les cultures étant conservées ensuite à la température du laboratoire ; c'est ainsi qu'elle est entretenue à la collection de l'Institut Pasteur,

b) soit dans le milieu synthétique de Lwoff et Querido en présence d'un excès d'acide nicotinique, les repiquages étant plus fréquents (au moins hebdomadaires) à 28°. C'est ainsi que nous l'avons entretenue depuis plus de deux ans au Service de Physiologie Microbienne de l'Institut Pasteur.

Le milieu indiqué par Möller et Birkofer contenant le mélange d'acides aminés et du nitrate de potassium permet un développement bactérien plus abondant pour une quantité donnée de nicotinamide ; il devrait donc permettre une précision plus grande pour les dosages de vitamine P. P. Mais, d'une part, les résultats que nous avons obtenus en présence de nitrates sont moins réguliers que ceux obtenus dans le milieu de Lwoff et Querido, d'autre part, la courbe d'étalonnage donnant la densité optique des cultures en fonction de la nicotinamide n'est plus une droite. Il nous semble donc préférable, pour effectuer des dosages, d'utiliser le milieu synthétique simple préconisé par Lwoff et Querido.

CHAPITRE IV

L'USURE DE LA NICOTINAMIDE

A. et M. Lwoff (1937) ont mis en évidence chez *H. parainfluenzæ* une usure notable des codéhydrogénases (coenzymes I et II) qui transportent l'hydrogène activé par les déshydrogénases. Cette usure ne se produit que lorsque les déshydrogénases fonctionnent, et ces auteurs ont émis l'hypothèse qu'elle était due à une altération de la nicotinamide. Nous avons pu retrouver un phénomène analogue chez *Proteus vulgaris* (1941) ; ce sont les expériences relatives à cette bactérie qui sont exposées ici.

USURE DES COENZYMES I ET II EN PRÉSENCE DE GLUCOSE

Etude de l'activité des systèmes déshydrogénants. — L'activité des systèmes déshydrogénants des bactéries a été suivie par la mesure, dans les tubes de Thunberg-Keilin, du temps de réduction d'une quantité donnée de bleu de méthylène. Nous avons constaté que pendant la phase logarithmique de la croissance, l'activité réductrice d'une culture de *Proteus* qui se développe en présence d'un excès de nicotinamide, reste constante, c'est-à-dire que le temps de réduction est inversement proportionnel à la densité optique des cultures. L'addition de nicotinamide à la suspension de bactéries, dans le tube de Thunberg est sans influence sur la vitesse de réduction du bleu de méthylène.

Nous avons alors étudié le comportement d'une culture de *Proteus* développée en présence de nicotinamide à la concentration de 2,7 γ pour 100 cm³, dans le milieu de Lwoff et Querido, l'aliment carboné étant le glucose. L'ensemencement était pratiqué avec une culture développée elle-même en présence d'une faible quantité d'acide nicotinique. La courbe de croissance obtenue dans ces conditions est une courbe en S caractéristique (fig. 4).

A divers stades de la croissance, des prélèvements ont été effectués

et la culture introduite dans des tubes de Thunberg à raison de 4 cm³ par tube. Le bleu de méthylène (250 γ) est introduit dans le diverticule du bouchon et l'acide nicotinique, soit directement dans les tubes, soit avec le bleu de méthylène dans le diverticule. Les résultats de 4 séries d'expériences — effectuées à 37° — sont donnés dans le tableau XIV et l'une des expériences représentée sur la figure 4.

On peut distinguer plusieurs périodes au cours de la croissance des bactéries.

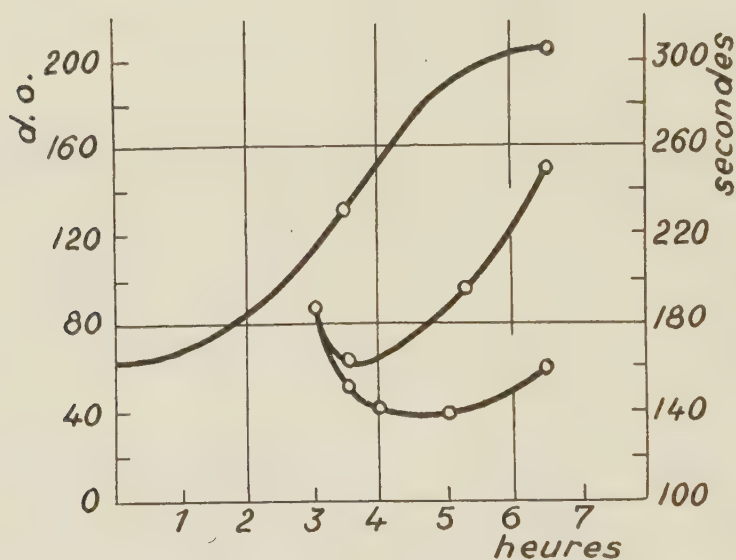


Fig. 4. — Croissance de *Proteus vulgaris* dans un milieu pauvre en nicotinamide et usure de la nicotinamide.

En abscisses : temps en heures. En ordonnées : à gauche (d. o.) densité optique en graduations de l'électrophotomètre de Meunier. En ordonnées : à droite (secondes), temps nécessaire pour la réduction de 96 o/o de 250 γ de bleu de méthylène par 4 cm³ de la culture prélevés au point correspondant de la courbe de croissance.

1° Courbe de croissance.

2° et 3° Temps de réduction à 37° du bleu de méthylène par 4 cm³ de culture : 2° non additionnée d'acide nicotinique ; 3° additionnée de 50 γ d'acide nicotinique.

1° Au cours de la première phase, logarithmique, de la croissance, il y a augmentation de l'activité réductrice parallèlement à l'augmentation de la densité optique. A ce stade, l'addition de nicotinamide aux bactéries dans les tubes de Thunberg n'entraîne pas de changements de l'activité réductrice.

2° A partir du moment où le point d'inflexion est atteint, l'activité réductrice diminue de 15 o/o par heure (20 o/o, 10 o/o, 15 o/o). L'addition de nicotinamide restaure l'activité réductrice à la valeur qu'elle avait au moment de l'inflexion de la courbe de croissance. Pendant cette période, qui dure de 2 à 3 heures à 37°, l'addition d'acide

Tableau XIV

USURE DE LA NICOTINAMIDE DES COENZYMES I ET II CHEZ « PROTEUS VULGARIS »
DANS UN MILIEU AU GLUCOSE

Age de la culture en heures	Densité optique	Temps de réduction en secondes (1)			Usure par heure (2) 0/0
		Sans acide nicotinique	Acide nicotinique dans la culture (3)	Acide nicotinique dans le diverticule	
Expérience I					
0	28				20
7	110	195	130	155	
9	137	280	132	162	
11	152	380	150	170	
Expérience II					
0	52				10
3,5	95	237	227	240	
6	146	170	130	130	
8,5	178	220	132	155	
10,5	189	292	135	157	
Expérience III					
0	60				15
3	114	187	185		
3,5	134	162	150		
4	155	165	140		
5	190	195	142		
6,5	206	250	160		
Expérience IV					
0	38				1.055
12	186	380	160	210	
15	206	425	207	245	
19	212	855	345	770	
21	212	1.200	472		

(1) Le temps de réduction est le temps nécessaire à la décoloration à 37°, par 4 cm³ de culture non centrifugée, de 96 o/o de 250 γ de bleu de méthylène.

(2) L'usure est calculée pendant la première heure qui suit le moment où la courbe de croissance passe par son point d'inflexion.

(3) La concentration d'acide nicotinique dans le milieu de culture est respectivement pour les expériences : expérience I, 5 γ ; expérience II, 4 γ ; expérience III, 4 γ ; expérience IV, 5 γ pour 150 cm³ de milieu.

(D'après M. Morel, 1941).

nicotinique dans le diverticule est suivie du même effet que l'addition dans la culture, mais le temps de réduction est prolongé de 20 secondes, période qui correspond vraisemblablement au temps nécessaire à l'absorption de l'acide nicotinique et à la synthèse des coenzymes. Cette deuxième période de 2 à 3 heures correspond à ce que l'on peut appeler la croissance résiduelle, croissance dont la vitesse tend progressivement vers zéro.

3° Vers la fin de cette période de croissance résiduelle, un nouveau phénomène intervient : la vitesse de réduction du bleu de méthylène continue à diminuer, mais l'addition de nicotinamide n'entraîne pas le retour à la vitesse initiale. Si l'acide nicotinique est introduit avec le bleu de méthylène dans les diverticules, l'augmentation du temps de réduction qui était de 20 secondes pendant la deuxième phase augmente régulièrement. Après quelques heures, l'addition d'acide nicotinique n'est suivie d'un effet que s'il est introduit dans la suspension bactérienne. Enfin, la triple centrifugation des bactéries qui est sans influence apparente sur l'activité des bactéries normales cultivées en présence d'un excès d'acide nicotinique, ou des bactéries pendant la première ou la deuxième phase de la croissance, entraîne une diminution considérable de l'activité des bactéries prélevées à la troisième phase. L'addition d'acide nicotinique n'exerce qu'une influence très faible sur ces bactéries centrifugées.

On peut interpréter ces résultats de la façon suivante. Pendant la première phase, les bactéries consomment l'acide nicotinique du milieu ; la croissance est normale. Pendant la deuxième phase, tout l'acide étant consommé, une certaine croissance — en fait une augmentation de la densité optique — a lieu cependant ; mais l'activité réductrice diminue. Enfin, au cours de la troisième phase, des altérations profondes des microbes se produisent. L'addition simultanée de bleu de méthylène et d'acide nicotinique est beaucoup moins efficace que l'addition préalable d'acide nicotinique, ce qui veut dire que le bleu de méthylène gêne l'absorption de l'acide nicotinique. La centrifugation entraîne pendant cette troisième phase, une diminution considérable de l'activité, et surtout l'acide nicotinique ne restaure que partiellement l'activité réductrice des bactéries lavées. Pendant cette période, il se produit donc vraisemblablement des altérations des structures et peut-être aussi des altérations des divers systèmes enzymatiques en plus de l'usure de la nicotinamide qui se poursuit.

Etude de la respiration. — Nous avons également étudié, à l'aide de l'appareil de Warburg, la respiration à 28° d'une culture de *Proteus*, développée en présence d'une faible quantité de nicotinamide (2 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³ de milieu). Les résultats des diverses expériences sont donnés sur les figures 5, 6 et 7. Dans l'expérience I, la culture de *Proteus* est introduite dans le respiromètre

après le point d'inflexion de la courbe de croissance. Les bactéries sont déjà carencées ; la culture à laquelle est ajoutée de la nicotinamide en excès (manomètre 1) respire plus que la culture témoin (manomètre 2). La culture n° 1 se développe normalement ; on voit que sa respiration croît suivant une courbe d'allure logarithmique. Pour la culture n° 2, au contraire, la respiration diminue d'une façon très notable pendant

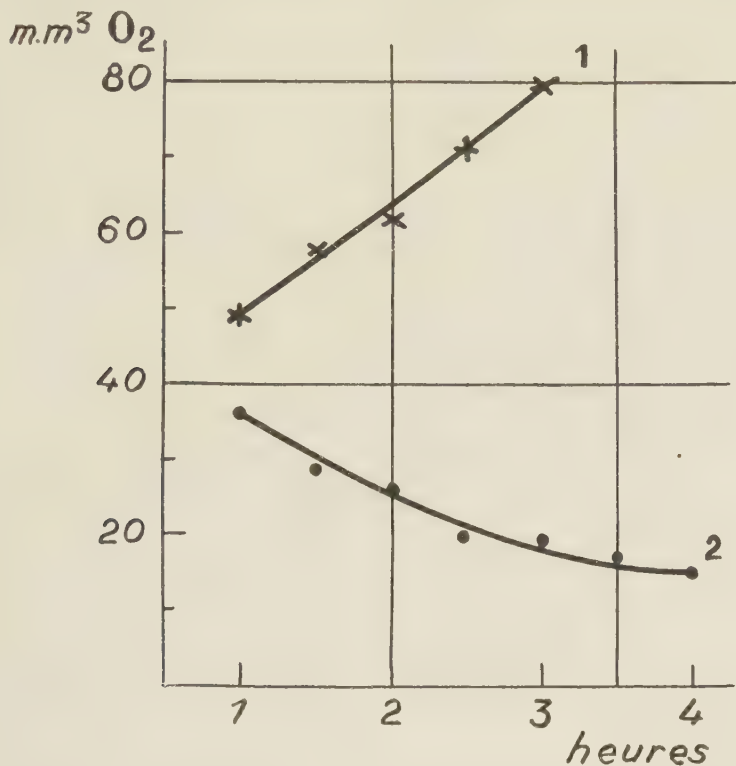


FIG. 5. — Expérience I. — Influence de l'acide nicotinique sur la respiration d'une culture carencée de *Proteus vulgaris*.

Consommation d'oxygène par 1/2 heure à 28° d'une culture de 4 heures, dont la courbe de croissance a atteint son point d'inflexion. Densité optique : 91 divisions de notre appareil de Meunier. Du glucose est ajouté à la culture avant l'introduction dans les fioles de l'appareil de Warburg.

1. = 2 cm^3 de culture + 0,1 cm^3 d'acide nicotinique 1×10^{-4} .

2. = 2 cm^3 de culture.

la première heure (27 o/o en 1 heure) puis la courbe semble s'aplatir et la respiration se stabiliser à un niveau très bas. Pendant ce temps, il y a encore des synthèses ; la densité optique de la culture qui était de 91 divisions de l'électrophotomètre au début de l'expérience, est passée en 4 heures à 126.

Dans une autre expérience, nous avons introduit dans l'appareil de Warburg une culture plus jeune ; l'addition d'un excès de nicotinamide n'augmente alors que très faiblement la consommation d'O₂. Pendant 1 h. 30 la respiration des cultures auxquelles on n'a pas ajouté de vitamine P. P. reste sensiblement stable, elle diminue ensuite régulièrement.

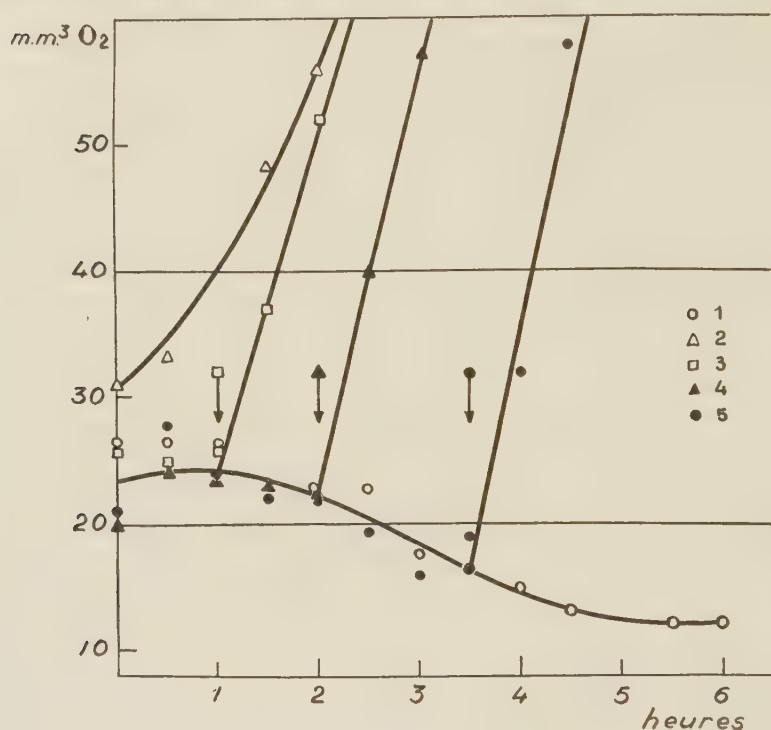


FIG. 6. — *Expérience II.* — Influence de l'acide nicotinique sur la respiration d'une culture carencée de *Proteus vulgaris*. Consommation d'oxygène par 1/2 heure.

La culture utilisée est une culture logarithmique de 3 heures dont la densité optique est de 75 divisions de notre électrophotomètre de Meunier. Du glucose a été ajouté avant l'introduction de la culture dans les fioles de l'appareil de Warburg. Les mesures sont faites à 28°.

1. 2 cm³ de culture.

2. 2 cm³ de culture + 0,1 cm³ d'acide nicotinique 1×10^{-4} .

3, 4, 5. 0,1 cm³ d'acide nicotinique 1×10^{-4} sont introduits dans la culture au moment indiqué par la flèche.

ment pendant 3 heures (environ 15 o/o par heure) puis se stabilise. L'addition de nicotinamide à des moments variables au cours de l'expérience, provoque une augmentation considérable de la consommation d'O₂ et entraîne la reprise de la croissance.

Dans une troisième expérience, la culture est introduite dans l'appareil

reil de Warburg après 2 heures seulement d'incubation. Les bactéries ne sont pas encore carencées. L'addition d'acide nicotinique n'a aucune action, la respiration croît lentement pendant 3 heures. On observe ensuite un plateau de 2 heures, suivi d'une diminution de la consom-

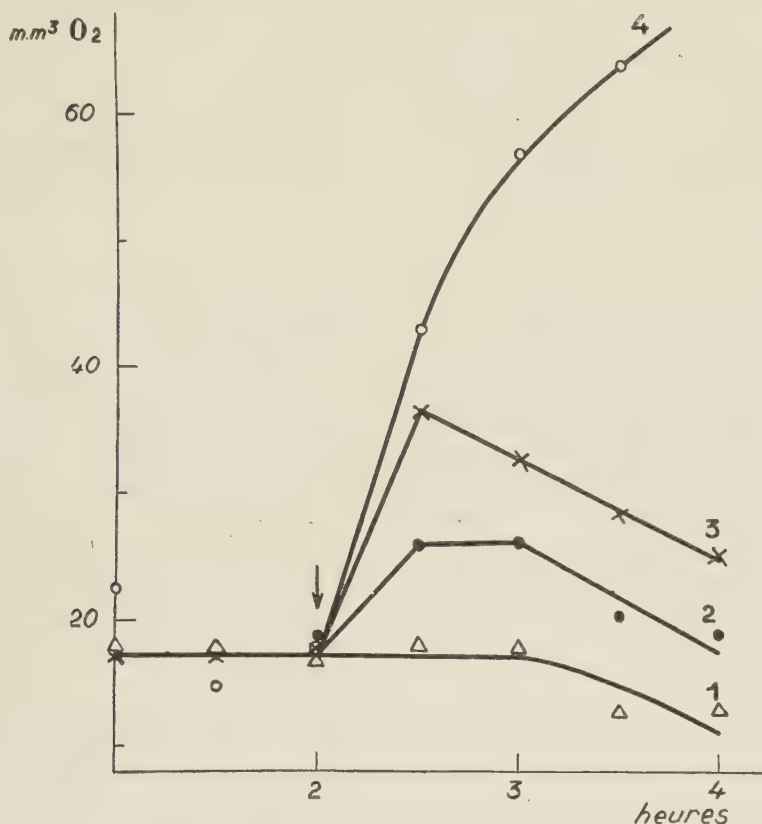


FIG. 7. — Expérience III. — Influence quantitative de l'acide nicotinique sur la respiration de *Proteus vulgaris*.

Une culture carencée additionnée de glucose est introduite dans les fioles de l'appareil de WARBURG. Au moment indiqué par la flèche, on ajoute à la suspension bactérienne :

2. 1×10^{-2} γ d'acide nicotinique.

3. 2×10^{-2} γ d'acide nicotinique.

4. 2×10^{-1} γ d'acide nicotinique.

La culture 1 sert de témoin

Les chiffres en ordonnées représentent la consommation d'O₂ à 28° par 1/2 heure.

mation d'O₂. A un moment donné, la respiration étant sensiblement constante, on ajoute aux cultures des quantités variables d'acide nicotinique : 2×10^{-4} γ, 2×10^{-3} γ, 1×10^{-2} γ, 2×10^{-2} γ, 2×10^{-1} γ, 2 γ pour 2 cm³ de suspension bactérienne. On obtient les résultats

suivants : des quantités d'acide nicotinique inférieures à 0,01 γ n'ont aucune action sur la consommation d'O₂ des cultures. Au contraire, si l'on ajoute aux cultures 0,01 et 0,02 γ d'acide nicotinique, dans la demi-heure suivante, la respiration est plus grande et l'augmentation est proportionnelle à la quantité d'acide nicotinique mise au contact des bactéries. L'addition de 0,02 γ d'acide nicotinique entraîne une augmentation de la consommation d'O₂ de 18 mm³ en 1/2 heure, celle de 0,01 γ provoque une augmentation de 7,5 mm³. On peut calculer ainsi que, en 1 seconde, une molécule d'acide nicotinique conditionne l'absorption de 2,4 molécules d'O₂ ce qui correspond à 4,8 réductions de la molécule de coenzyme par seconde en ne tenant compte que de l'hydrogène intervenant dans la respiration.

USURE DU COENZYME I EN PRÉSENCE D'ACIDE PYRUVIQUE

Dans les milieux au glucose, il y a usure simultanée des coenzymes I et II, le coenzyme II intervenant dans la déshydrogénation du glucose phosphorylé, le coenzyme I dans la déshydrogénation des produits de dégradation de l'hexosephosphate. A. et M. Lwoff ont montré que chez *Hemophilus parainfluenzæ*, l'usure du coenzyme II ne se produit qu'en présence de glucose ou d'hexosephosphate, c'est-à-dire en présence des substrats des enzymes fonctionnant avec ce coenzyme. Si l'usure des coenzymes est vraiment liée à leur fonctionnement, on doit retrouver le même phénomène chez *Proteus vulgaris*. C'est ce qui se produit effectivement.

Adaptation de la souche au pyruvate. — Une souche de *Proteus vulgaris* a été « adaptée » au pyruvate par culture en série dans des milieux renfermant du pyruvate de sodium comme seul aliment carboné; les cultures sont effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer pour assurer une oxygénation suffisante. La vitesse de réduction du bleu de méthylène en présence de pyruvate comme substrat est, pour une souche normale entretenue en présence de glucose, 8,2 o/o de la vitesse de réduction en présence de glucose. Au cours des passages dans les milieux au pyruvate, la vitesse de déshydrogénation du glucose ne varie pas sensiblement, alors que la vitesse de déshydrogénation du pyruvate augmente progressivement et devient supérieure à celle du glucose (tableau XV). Toutefois, la vitesse de croissance dans un milieu au pyruvate oxygéné par agitation est la même, qu'il s'agisse d'une culture ayant subi 1 ou 35 passages dans un milieu au pyruvate. La densité optique de deux souches, adaptée ou non adaptée, double en 2 heures à 37°.

Tableau XV

ADAPTATION DU « PROTEUS » AU PYRUVATE DE SODIUM

	Temps de réduction du bleu de méthylène en présence		Vitesse relative de déshydrogénation du pyruvate
	de glucose	de pyruvate	
Souche normale « glucose »....	300	3.060	10
Souche « pyruvate » :			
Après 7 repiquages	315	724	44
» 35 »	285	206	138

Le temps de réduction du bleu de méthylène représente le temps en secondes nécessaire pour la réduction de 96 o/o de 250 γ de bleu de méthylène par 4 cm³ d'une suspension de bactéries de densité optique 100, prélevées au voisinage de la phase logarithmique de croissance. Les cultures ont été centrifugées et lavées deux fois.

La vitesse relative de déshydrogénation du pyruvate est calculée en fixant arbitrairement à 100 la vitesse de déshydrogénation du glucose et en comparant à celle-ci la vitesse de déshydrogénation du pyruvate.

(D'après M. Morel, 1941).

Usure du coenzyme I. — La souche adaptée au pyruvate, commencée dans un milieu pauvre en nicotinamide, se développe suivant une courbe en S, tout comme la souche en glucose dans un milieu carencé en facteur de croissance. Lorsque la croissance logarithmique est terminée, les bactéries commencent à se carencer en nicotinamide : en effet, la vitesse de déshydrogénation du pyruvate diminue progressivement et cette valeur est ramenée, par addition de nicotinamide, au niveau qu'elle montrait pendant la croissance.

Cette usure de la nicotinamide se produit, dans les milieux au pyruvate comme dans les milieux au glucose, en l'absence d'augmentation de la densité optique. L'expérience suivante le montre. On suit à l'électrophotomètre de Meunier la densité optique d'une culture de *Proteus* dans un milieu au pyruvate pauvre en nicotinamide (à 37°); lorsque le plateau semble atteint, on mesure la vitesse de déshydrogénation du pyruvate; 3 heures plus tard, la densité optique n'ayant pas sensiblement changé, le temps de réduction du bleu de méthylène est passé de 180 secondes à 275 secondes (tableau XVI). En présence d'acide nicotinique, les temps de réduction ont été respectivement de 125 et 175 secondes. On voit que, comme dans les expériences en présence de glucose, on peut supprimer la carence en nicotinamide par addition de cette substance, mais que, dans les cultures anciennes, la carence est accompagnée d'une diminution de l'activité enzymatique. L'usure semble donc se poursuivre ici comme dans les

autres expériences (milieux au glucose) en l'absence de synthèses, tout au moins en l'absence de synthèses se traduisant par une augmentation de densité optique. L'usure semble donc liée au fonctionnement des coenzymes. Cette usure est d'ailleurs plus rapide (15 0/0 par heure) pour les bactéries cultivées en présence de glucose que pour les bactéries cultivées en présence de pyruvate (7 0/0). Il faut noter que, dans les conditions de l'expérience, la croissance dans des vases à

Tableau XVI

USURE DE LA NICOTINAMIDE DU COENZYME I DANS LE MILIEU AU PYRUVATE

Age de la culture en heures	Densité optique	Temps de réduction en secondes (1)		Usure par heure 0/0
		Sans acide nicotinique	Acide nicotinique dans la culture	
Expérience I				
16	115	135	135	7,6
20,5	142	160	137	
22,5	153	230	160	
Expérience II				
24	129	195	130	5
28,5	142	260	170	
31	146	295	180	

(1) Le temps de réduction est le temps nécessaire à la décoloration à 37° par 4 cm³ de culture, de 96 0/0 de 250 γ de bleu de méthylène. La concentration d'acide nicotinique dans le milieu de culture était, dans ces expériences, de 3 γ pour 150 cm³ de milieu. La culture a été introduite telle quelle, sans lavage, dans les tubes de Thunberg.

(D'après M. Morel, 1941).

toxine non agités, c'est-à-dire dans des milieux non oxygénés au maximum, est environ deux fois et demie plus rapide en présence de glucose qu'en présence de pyruvate. Cette différence de vitesse tient probablement à ce que la croissance du *Proteus vulgaris* en présence de glucose peut s'effectuer en anaérobiose, alors que la croissance aux dépens du pyruvate ne se produit qu'en aérobie, à moins que l'on n'ajoute aux cultures privées d'oxygène un accepteur d'hydrogène, comme par exemple du nitrate de potassium.

Non-usure du coenzyme II. — Nous avons retrouvé chez *Proteus vulgaris* le phénomène décrit par A. et M. Lwoff pour *Hemophilus*

parainfluenzæ (voir tableau XVII). Les expériences ont été réalisées avec des cultures carencées, centrifugées et lavées, de façon que le pyruvate du milieu de culture soit éliminé. L'examen des chiffres montre que les bactéries cultivées dans un milieu au pyruvate pauvre

Tableau XVII

NON-USURE DE LA NICOTINAMIDE DU COENZYME II
DANS UN MILIEU AU PYRUVATE DE SODIUM

Age de la culture en heures	Densité optique	Temps de réduction en secondes en présence			
		de pyruvate		de glucose	
		Témoin	+ acide nicotinique	Témoin	+ acide nicotinique
Expérience I					
26	105	300	165	250	255
Expérience II					
28	123	180	125	155	160
31	126	275	175	150	155

Le temps de réduction est le temps nécessaire à la décoloration à 37° par 4 cm³ de culture, de 96 o/o de 250 γ de bleu de méthylène. La concentration en acide nicotinique dans le milieu de culture était de 3 γ pour 150 cm³ de milieu. Les cultures ont été centrifugées et lavées une fois. Dans ces conditions, dans le témoin sans substrat, il n'y a pas, après 1 h. 30, de réduction visible du bleu de méthylène.

(D'après M. Morel, 1941).

en nicotinamide, une fois leur croissance terminée, sont carencées en nicotinamide. Mais cette carence ne porte que sur la nicotinamide du coenzyme I. L'addition d'acide nicotinique restaure en effet, nous l'avons vu, la vitesse de déshydrogénation du pyruvate à sa valeur normale. Au contraire, la vitesse de déshydrogénation du glucose ne subit pas de changement au cours du vieillissement des cultures carencées, et cette vitesse n'est pas modifiée par addition d'acide nicotinique. De nombreuses expériences, dont les chiffres ne sont pas donnés ici, ont fourni les mêmes résultats. Nous pouvons donc conclure que, chez *Proteus vulgaris* cultivé dans un milieu au pyruvate, il se produit une usure de la nicotinamide du coenzyme I et non du coenzyme II.

A. et M. Lwoff ont obtenu ainsi, chez *Hemophilus parainfluenzæ*, des organismes contenant une charge normale de coenzyme de Warburg et des quantités très faibles de cozymase; on peut donc conclure

que les bactéries sont incapables de transformer le coenzyme de Warburg en cozymase, ou bien que cette réaction est extrêmement lente; ceci est en contradiction avec le fait que *Hemophilus parainfluenzæ* peut utiliser les coenzymes I et II comme facteurs de croissance. Pour expliquer cette contradiction apparente, A. et M. Lwoff ont émis l'hypothèse que les coenzymes existent dans la cellule dans deux états différents :

1° à l'état libre, immédiatement après l'absorption. La réaction coenzyme I $\rightleftharpoons$ coenzyme II est alors possible;

2° à l'état combiné (sans doute combinaison de la déshydrogénase avec la codéshydrogénase); à ce stade la transformation des coenzymes l'un dans l'autre n'est plus possible.

Chez *Proteus vulgaris*, organisme capable de synthétiser les coenzymes à partir de la nicotinamide, on observe un phénomène analogue, les bactéries sont incapables, une fois les coenzymes fixés dans les cellules, d'utiliser la nicotinamide de l'un pour synthétiser l'autre.

CHAPITRE V

RELATION ENTRE LE BESOIN EN NICOTINAMIDE ET LE MÉTABOLISME

L'ensemble de nos expériences montre donc que, pour *Proteus vulgaris* comme pour *Hemophilus parainfluenzæ*, l'usure des coenzymes I et II est liée à leur fonctionnement. Par culture dans un milieu au pyruvate, pauvre en nicotinamide — et dépourvu de glucose —, c'est-à-dire dans un milieu où le coenzyme II ne fonctionne pas, on peut obtenir des bactéries carencées en coenzyme I et non carencées en coenzyme II. Ces expériences démontrent aussi que, conformément à l'hypothèse émise par A. et M. Lwoff, l'usure des coenzymes est due à l'usure de la nicotinamide de ces coenzymes, puisque l'addition de nicotinamide à des cultures carencées est suivie du retour à la vitesse normale de déshydrogénation.

Cette conclusion nous semble la mieux adaptée aux résultats que nous venons d'exposer. Il ne faudrait cependant pas se dissimuler le caractère hypothétique de l'explication qui vient d'être donnée et on peut se demander si d'autres interprétations ne seraient pas également plausibles. On peut en effet envisager d'une autre façon la diminution de l'activité enzymatique dans les cultures carencées en nicotinamide. Il existe dans les tissus animaux un enzyme détruisant le facteur V, c'est-à-dire les coenzymes I et II. Mann et Quastel ont montré que l'amide nicotinique protégeait la cozymase contre l'action de la cozymase-nucléotidase. Il est possible qu'il existe chez les bactéries une coenzyme-nucléotidase qui tendrait à hydrolyser les coenzymes I et II. En présence d'amide nicotinique en excès, son activité serait partiellement inhibée alors qu'elle serait plus efficiente dans les organismes carencés. Il y aurait donc chez ceux-ci destruction des coenzymes avec formation de composés beaucoup moins actifs que la nicotinamide. Il faut remarquer toutefois que chez *Hemophilus parainfluenzæ*, l'usure des coenzymes a été observée dans des milieux peptonés, c'est-à-dire en présence de nicotinamide en quantité appréciable. D'autre part, on peut invoquer à l'encontre de cette hypothèse, le fait que l'usure des coenzymes ne se produit qu'en présence de leur substrat. Le problème du rôle possible des coenzymes-nucléotidasés dans le phénomène que nous étudions se trouve donc posé, mais nous manquons actuellement

de données permettant de le résoudre. Quoi qu'il en soit si l'usure des coenzymes est liée à leur fonctionnement on doit s'attendre à observer des modifications du besoin en nicotinamide en relation avec le changement du métabolisme.

Influence de l'oxygénation. — Lwoff et Querido (1938) ont constaté que dans les conditions précises que nous avons décrites dans le chapitre I, le développement des cultures n'est proportionnel à la concentration du milieu en facteur de croissance que dans certaines limites variant avec l'oxygénation du milieu. La courbe s'infléchit pour une concentration de 0,6 à 0,7 γ d'acide nicotinique pour 100 cm³ lorsque les cultures sont effectuées en tubes de 16 mm. de diamètre contenant 9 cm³ de milieu, et vers 1,2 γ pour des fioles d'Erlenmeyer de 100 cm³ en contenant 10 cm³. La consommation d'acide nicotinique est donc plus élevée lorsque le milieu est moins aéré.

On peut admettre que le métabolisme anaérobie exige, pour fournir la même quantité d'énergie, la mobilisation de beaucoup plus d'hydrogène que le métabolisme aérobie. Etant donné ce que l'on sait des relations entre le fonctionnement des coenzymes et l'usure de la nicotinamide et du rôle joué par les coenzymes dans le métabolisme des glucides et des acides aminés, le besoin augmenté d'acide nicotinique en anaérobiose peut se concevoir facilement.

Influence des accepteurs d'hydrogène. — Nous avons montré dans un chapitre précédent que l'addition de nitrate de potassium diminuait la consommation d'acide nicotinique de *Proteus vulgaris*. Nous avons vu également que, en présence de nitrate, il y avait formation de nitrites et qu'il existait une relation quantitative entre les nitrites formés et le développement microbien conditionné par la concentration du milieu en acide nicotinique. Il semble donc y avoir une relation entre le métabolisme lié à la croissance et la réduction des nitrates. La formation de 26 mgr. de nitrites pour 100 cm³ de culture correspond à l'utilisation de $0,75 \times 10^{-3}$ molécules-grammes d'H. 100 cm³ d'une culture d'une même densité optique respirant normalement consomment en 1 heure $8,4 \times 10^{-5}$ molécules-grammes d'O₂. Il est difficile de calculer exactement la consommation totale d'O₂ de la culture pendant la formation de ces $0,75 \times 10^{-3}$ molécules-grammes de nitrites. Cependant, on peut évaluer approximativement la respiration de la culture à un moment donné. Nous choisirons la période correspondant à la fin de la phase de croissance logarithmique et nous admettrons que la densité optique à ce moment est le 1/4 de la densité optique maximum soit $\frac{60}{4} = 15$. Les mesures faites avec l'appareil de Warburg ont montré que 1 cm³ de culture de cette densité optique consomme en 1 heure, à 28°, 6 mm³ d'O₂, 100 cm³ en consomment 600 mm³ soit $2,6 \times 10^{-5}$ molécules-grammes d'O₂. La respiration est

évidemment plus faible avant la période considérée et diminue par la suite. Si la respiration était au même niveau durant les 36 heures de l'expérience, la consommation totale d'O₂ serait de $93,6 \times 10^{-5}$ molécules-grammes ; elle est en réalité plus faible. En tout cas la quantité de nitrate réduite correspond à un nombre de molécules-grammes d'H₂ notablement supérieur à la quantité d'O₂ respiratoire globale.

D'après nos expériences, les nitrates sont sans influence sur la consommation d'O₂ de *Proteus vulgaris*. Il paraît donc certain qu'en présence de nitrates le métabolisme de l'H est non seulement différent qualitativement mais encore quantitativement. Il ne semble donc pas s'agir dans le cas particulier d'un phénomène banal et on est bien obligé d'admettre que la réduction des nitrates implique une réaction particulière dans les déshydrogénations, entraînant une économie considérable de nicotinamide. A l'appui de cette conclusion nous invoquerons le fait que le développement de la souche P n'est augmenté que de 12 o/o par les nitrates, alors que ceux-ci augmentent le développement de la souche N de 40 o/o. Rappelons qu'Aubel et Egami ont montré que les systèmes enzymatiques intervenant dans l'oxydation de l'acide lactique étaient différents suivant que l'accepteur d'H était le bleu de méthylène ou le nitrate de potassium. Il est possible qu'un phénomène de cet ordre intervienne ici. Cependant, les choses semblent plus complexes. Il résulte de nos expériences que la souche P n'est pas capable de profiter au même titre que la souche N de la présence des nitrates. Il est d'ailleurs très remarquable que la souche P réduit les nitrates comme la souche N, et que la quantité de nitrites formés par les deux souches est sensiblement la même. Il ne suffit donc pas que l'hydrogène soit accepté par un nitrate pour que soit réalisée une économie de nicotinamide. Ceci pourrait indiquer que le transport de l'hydrogène vers les nitrates se produit chez les deux souches par deux mécanismes enzymatiques différents.

Influence des acides aminés. — Nous avons vu également que l'addition au milieu de culture d'un mélange d'acides aminés diminuait considérablement le besoin en acide nicotinique. Cette augmentation du rendement de la croissance en fonction de la nicotinamide peut s'expliquer de deux façons :

a) Les acides aminés serviraient d'accepteurs d'hydrogène et agiraient par un mécanisme analogue à celui du nitrate et du fumarate. Contre cette hypothèse, nous voyons le fait que les acides aminés diminuent moins la consommation d'acide nicotinique pour la souche N (39 o/o) que pour la souche P (65 o/o) alors que pour ce qui concerne les nitrates on observe un phénomène inverse.

b) Les acides aminés présents dans le milieu seraient utilisés directement en tant que constituants des protides et le travail de synthèse de la bactérie se trouverait ainsi considérablement diminué. L'économie

réalisée rendrait compte de la diminution de la consommation de nicotinamide. Il restait alors à expliquer pourquoi les souches N et P se comportent de façon différente.

Le développement de la souche N est augmenté de 39 o/o par le mélange d'acides aminés, celui de la souche P de 65 o/o. Mais en présence des acides aminés, le développement de la souche P est cependant loin d'atteindre celui de la souche N. Le fait que le besoin en nicotinamide de la souche P est supérieur à celui de la souche N pourrait être rapproché de celui que le pourcentage d'augmentation observé en présence d'acides aminés est plus grand pour cette souche P que pour la souche N; et on pourrait envisager que la transformation $N \rightarrow P$ entraîne un trouble du métabolisme des acides aminés. Il faut noter d'ailleurs que deux acides aminés isolés ont diminué le besoin en nicotinamide de *Proteus vulgaris*; ce sont l'isoleucine et l'acide aspartique qui agissent uniquement sur la souche P et sont totalement dépourvus d'action sur la souche N. Il est donc possible que la différence entre les souches N et P porte seulement sur la synthèse de certains acides aminés. C'est ici le lieu de se demander si ce n'est pas en raison même de cette différence que le comportement des deux souches vis-à-vis des nitrates serait différent et si cette différence ne pourrait pas précisément être mise en relation avec le changement du métabolisme des acides aminés.

Il convient de remarquer que la carence en acide nicotinique, si elle entraîne manifestement une diminution de la teneur en coenzymes, peut réagir d'une façon secondaire sur divers constituants et partant sur diverses propriétés des bactéries. C'est ainsi par exemple que la sensibilité à la centrifugation est considérablement accrue chez les bactéries carencées; nous avons montré aussi que l'affinité relative pour l'acide nicotinique et le bleu de méthylène subissait également des modifications importantes. Mais ces deux types de modification ne surviennent qu'à la phase avancée de la carence et semblent irréversibles. Il s'agit manifestement d'une altération profonde des structures causée par la diminution de la teneur en nicotinamide car l'addition de nicotinamide en excès ne ramène pas les bactéries à leur état normal. On peut aussi se demander si le phénomène que nous avons interprété comme l'usure spécifique du coenzyme I en présence de pyruvate et en l'absence de glucose, ne pourrait pas être dû à une usure des enzymes eux-mêmes, en l'espèce, des déshydrogénases spécifiques. Cette hypothèse ne peut être entièrement exclue mais il faut cependant noter que les systèmes enzymatiques voient leur activité revenir à une valeur que l'on peut considérer comme normale par addition d'acide ou d'amide nicotinique. Ceci plaide manifestement en faveur de l'hypothèse que nous avons adoptée : usure de la nicotinamide des coenzymes.

CHAPITRE VI

RÉACTION DU PROTEUS AUX COENZYMES I ET II

Les coenzymes I et II sont responsables du transport de la plus grande partie de l'hydrogène métabolisé. Ils ont été retrouvés dans tous les organismes vivants chez lesquels on les a recherchés ; ce sont des constituants fondamentaux de la substance vivante, des « métabolites essentiels » au sens de Fildes. Comme la nicotinamide est une partie constitutive des coenzymes I et II, il est bien évident que la présence de cette substance, qu'elle soit d'origine endogène ou exogène, est nécessaire à leur synthèse.

Fildes a montré effectivement que *Proteus vulgaris* cultivé dans un milieu synthétique en présence de nicotinamide libre le facteur de croissance nécessaire à *Hemophilus parainfluenza*, c'est-à-dire, comme l'ont montré A. et M. Lwoff, les coenzymes I et II. Knight a obtenu le même résultat avec *Staphylococcus aureus* et Dorfman et ses collaborateurs avec les bacilles dysentériques. Il était donc très vraisemblable que le rôle de la nicotinamide pour *Proteus vulgaris* était essentiellement celui de partie constitutive des coenzymes I et II. Dans ces conditions, on pouvait supposer que l'un ou l'autre de ces coenzymes devaient la remplacer quantitativement. Mais il n'en est pas ainsi.

Lwoff et Querido ont étudié l'utilisation du coenzyme II par *Proteus vulgaris* et constaté : 1° que le développement bactérien était le même en présence d'une quantité donnée de nicotinamide et d'une quantité équimoléculaire de coenzyme II ; 2° que le test *Proteus* donnait les mêmes résultats avec une solution de coenzyme II filtrée sur bougie et avec ce filtrat autoclavé.

Influence sur la croissance. — Nous avons voulu étendre ces résultats au coenzyme I. Voici ce que nous avons observé : avec une solution de cozymase pure (1), filtrée et n'ayant subi aucune hydrolyse

(1) Nous sommes redevable de la cozymase pure au professeur P. Karrer que nous sommes heureux de remercier ici.

on ne retrouve que 47 à 54 o/o de la nicotinamide théorique. Si le filtrat est autoclavé pendant 1 heure à 130° en milieu alcalin (1 goutte de soude 10 N pour 20 cm³ de solution), le développement bactérien correspondant est plus élevé; on retrouve environ 70 o/o de la nicotinamide théorique. Si le filtrat est hydrolysé en milieu fortement acide (5 o/o HCl pur) puis neutralisé exactement, on retrouve alors 96 o/o de la nicotinamide du coenzyme.

Tableau XVIII

ASSIMILATION DE LA COZYMASE ET DE SES PRODUITS D'HYDROLYSE
PAR « *PROTEUS VULGARIS* »

Cozymase pure	γ pour 100 cm ³ de solution	0/0 de la cozymase retrouvée
Cozymase ajoutée	65,1	
» trouvée (1) : Filtrat non hydrolysé ...	34,8	54 o/o
» » hydrolyse alcaline	47,3	73 »
» » » acide	63,2	96 »
Cozymase ajoutée	90	
» trouvée (1) : sans hydrolyse	42	47 »
» » après hydrolyse alcaline.	57	63 »
Cozymase impure (50 0/0)		
Cozymase ajoutée	65,9	
» trouvée (1) : sans hydrolyse	44	66 »
» » après hydrolyse alcaline.	45,9	66 »
» » » acide :.	43	66 »

(1) Calculée d'après le titre en nicotinamide correspondant au développement bactérien observé.

Nous avons étudié aussi un échantillon de cozymase impure, de titre approximatif 50 o/o. Une solution de cette cozymase, qu'elle soit filtrée ou hydrolysée en milieu alcalin, permet le même développement de *Proteus vulgaris*. Cet échantillon était de la cozymase extraite du muscle, alors que la cozymase pure provenait de la levure.

Nous avons alors repris les expériences de Lwoff et Querido relatives à l'utilisation du coenzyme II par *Proteus vulgaris*. Le filtrat, et le filtrat autoclavé en milieu neutre ont donné des résultats identiques; mais le filtrat autoclavé en milieu acide permet un développement de 14 à 24 o/o plus élevé que le filtrat non hydrolysé. Le

Proteus ne serait donc pas capable d'utiliser toute la nicotinamide du coenzyme II. Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par Lwoff et Querido. Nous n'avons malheureusement pu pousser plus loin nos recherches, notre provision de coenzyme II étant épuisée. La question reste donc en suspens.

De nos expériences relatives à la cozymase, nous pouvons donc conclure :

1° que l'activité d'une solution de coenzyme I pour la croissance de *Proteus vulgaris* est 50 o/o plus faible que celle d'une solution équimoléculaire de nicotinamide ; nous discuterons plus loin les hypothèses que l'on peut envisager pour expliquer ce phénomène ;

2° l'hydrolyse à 130° d'une solution de cozymase en milieu neutre ou légèrement alcalin quoique détruisant entièrement son activité en tant que facteur V, c'est-à-dire détruisant la molécule de cozymase, ne libère qu'une très faible partie de la nicotinamide ; seule l'hydrolyse en milieu acide la libère totalement.

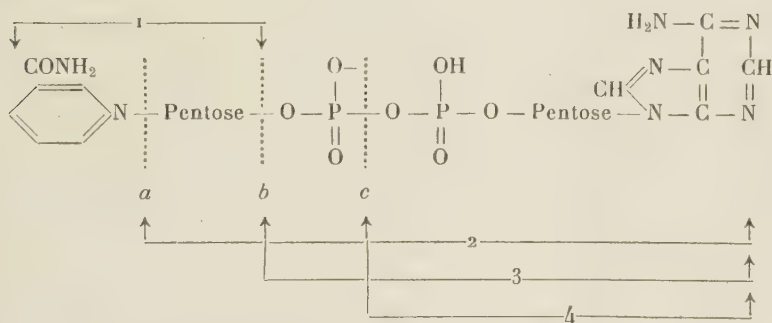


FIG. 8. — Les modalités possibles de la scission de la cozymase (d'après Schlenk, Euler, Heiwinkel, Gleim et Nyström).

Euler, Albers et Schlenk (1936) ont constaté, en effet, que par hydrolyse acide, toute l'amide nicotinique du coenzyme I était libérée. Schlenk, Euler, Heiwinkel, Gleim et Nyström (1937) ont étudié en détail l'action des alcalis sur la cozymase. Suivant la température d'hydrolyse, ce sont les fractions 2 ou 3 (fig. 8) qui sont libérées, ces deux fractions étant actives en tant que cophosphorylase. La scission peut se faire d'abord en *b* ou en *a*. En fait, nos expériences démontrent que l'amide nicotinique n'est pas libérée intégralement dans ces conditions, la coupure ne peut donc se faire qu'en *b*, libérant le pyridine-nucléoside : amide nicotinique, *d*-ribose. On peut alors envisager deux hypothèses :

a) ou bien ce pyridine-nucléoside est directement utilisable pour la synthèse des coenzymes et dans ce cas, il est difficile de concevoir pourquoi il ne possède pas la même activité qu'une solution équimoléculaire de nicotinamide ;

b) ou bien ce nucléoside n'est pas utilisable tel quel pour la synthèse des coenzymes et on pourrait alors s'attendre à ce qu'il soit moins actif que la cozymase.

L'hypothèse ne doit pas être exclue toutefois que l'hydrolyse alcaline entraîne la libération d'une petite proportion d'amide nicotinique. Par ailleurs le pyridine-nucléoside, assez stable puisqu'il n'est pas détruit par chauffage en milieu alcalin, est complètement hydrolysé par autoclavage de 1 heure à 130° en présence de 5 o/o d'acide chlorhydrique.

Influence sur la respiration. — Après avoir clos la série de nos expériences, nous avons pris connaissance d'un mémoire de Saunders, Dorfman et Koser paru en 1941. Les auteurs américains ont étudié la respiration des cultures de *Proteus vulgaris* et de bacilles dysentériques carencés en vitamine P. P. Les résultats relatifs à ceux-ci seront discutés dans un des chapitres suivants ; nous nous contenterons de résumer ici les expériences concernant *Proteus*.

Proteus vulgaris est cultivé dans un milieu glucosé pauvre en nicotinamide, les corps microbiens sont lavés et la respiration est étudiée en présence de glucose. La consommation d'O₂ est considérablement augmentée par l'addition des coenzymes I et II, de nicotinamide, d'acide nicotinique et de méthyl nicotinate. Il en est sans doute de même du coenzyme I mais les auteurs ne le précisent pas. Si c'est le lactate ou le glutamate qui sont utilisés comme substrat, seul le diphospho-pyridino-nucléotide augmente la respiration, les autres substances sont inactives. Il faut remarquer que *Proteus vulgaris* est parfaitement capable de synthétiser les coenzymes I et II à partir de la nicotinamide dans un milieu où l'aliment carboné est le lactate ; ceci ressort à l'évidence des expériences de Fildes. Il est donc difficile d'interpréter les expériences de Saunders et de ses collaborateurs à moins d'admettre que les bactéries que ces auteurs utilisaient, déjà fatiguées par une carence prolongée, ont été encore notablement altérées par des lavages successifs. Nous avons montré en effet l'influence néfaste de centrifugations répétées sur des organismes très carencés. On peut donc supposer que le *Proteus* ainsi modifié était devenu incapable de synthétiser le coenzyme I à partir de la nicotinamide et aussi de transformer le coenzyme II en coenzyme I. Les phénomènes observés par Saunders et ses collaborateurs sont donc vraisemblablement sous la dépendance d'altérations physiologiques profondes des bactéries.

De l'ensemble de leurs expériences relatives à l'assimilation des coenzymes et de leurs produits d'hydrolyse par *Proteus vulgaris* et *Shigella dysenteriae*, Saunders et ses collaborateurs ont conclu que la nicotinamide est liée aux oxydations cellulaires d'une façon autre que comme matériel servant à la synthèse des pyridino-nucléotides. Il

y aurait formation d'une substance inconnue qui serait synthétisée à partir de la nicotinamide plus rapidement qu'à partir des coenzymes I et II. Cette substance pourrait être, d'après les auteurs américains, un hémochromogène. A l'appui de cette hypothèse est invoqué le fait que l'hématine et les phospho-pyridino-nucléotides sont tous deux nécessaires à *Hemophilus influenza*; ceci indiquerait « une relation possible entre les fonctions de ces deux substances ». Cet argument nous paraît discutable. Le fait que deux ou plusieurs facteurs de croissance sont nécessaires à un même organisme ne démontre pas nécessairement l'existence d'une relation entre leurs fonctions. Cela veut dire tout simplement que l'organisme est incapable de les synthétiser.

Discussion. — Nos expériences sur la croissance aboutissent dans l'ensemble aux mêmes résultats que celles de Saunders et de ses collaborateurs sur la respiration. Sommes-nous vraiment en droit de conclure avec les auteurs américains que la nicotinamide a un autre rôle que celui de constituant des coenzymes I et II? Contre cette hypothèse, nous voyons les faits suivants :

1° dans certaines préparations de cozymase impure, il semble qu'il existe une substance qui ne contient pas de nicotinamide et qui augmente considérablement l'activité du coenzyme I en tant que facteur de croissance; à moins que le comportement différent du *Proteus* à l'égard des deux échantillons de cozymase que nous avons étudiés ne tienne à ce que l'un était d'origine animale et l'autre d'origine végétale;

2° dans le sang total, ou dans le sang déprotéiné, le chauffage, soit en milieu neutre, soit en milieu acide (voir chap. XI), n'augmente la croissance de *Proteus vulgaris* que de 15 à 50 o/o. Or, le filtrat ou le sang non hydrolysés renferment, d'après Euler, Schlenk, Heiwinkel et Högberg, un mélange de coenzymes I et II en proportion sensiblement égale. Ceci pourrait donc indiquer que les mélanges de coenzymes I et II sont plus actifs que les coenzymes isolés, sinon l'augmentation du rendement par hydrolyse serait plus grande. On peut alors envisager l'hypothèse que la mauvaise utilisation des coenzymes I et II fournis isolément puisse tenir à des difficultés de leur intertransformation, et se demander si un mélange en proportion voulue de coenzymes I et II ne donnerait pas le même résultat qu'une quantité équimoléculaire de nicotinamide. Mais on peut aussi supposer qu'il existe dans le sang une substance favorisant l'assimilation des coenzymes I et II.

Il faut remarquer que, toutes les expériences relatives à l'utilisation des coenzymes ayant été faites avec des milieux où l'aliment carboné est constitué par du glucose, les coenzymes I et II sont tous deux indispensables au métabolisme. Le coenzyme I ne peut donc agir

comme seul facteur de croissance que s'il est susceptible d'être transformé partiellement en coenzyme II et réciproquement. Cette transformation peut être effectuée par *Hemophilus parainfluenzae* (A. et M. Lwoff). Mais elle ne se réalise toutefois aisément que pour les coenzymes libres ; elle est nulle ou très lente quand les coenzymes sont combinés dans les microbes à leurs enzymes spécifiques.

Nous avons vu (chap. IV) que chez *Proteus vulgaris* comme chez *Hemophilus* les coenzymes combinés ne sont pas transformés l'un dans l'autre. Notons que Euler et Adler, puis Euler, Adler et Eriksen ont observé une transformation enzymatique réversible du coenzyme I en coenzyme II en présence d'une macération de levure. E. Adler, S. Elliot et L. Elliot ont repris cette étude et ont pu en élucider le mécanisme : la présence d'hexose-diphosphate est nécessaire pour que la phosphorylation du coenzyme I soit possible. Le comportement différent des deux préparations de cozymase que nous avons étudiées aurait pu s'expliquer en supposant que la préparation impure contenait une substance qui active la phosphorylation du coenzyme I. Malgré que des traces d'acide adénylique suffisent pour assurer cette phosphorylation, nous avons tenu cependant à examiner l'action possible de ce nucléotide. Mais ni l'acide adénylique de la levure ni celui du muscle n'ont provoqué une augmentation du développement en fonction de la cozymase. L'hexose-diphosphate à la concentration de 0,5 o/o a également été essayée sans succès. Il reste cependant possible que les divers organismes effectuent l'intertransformation des coenzymes avec plus ou moins de facilité.

On peut également envisager l'hypothèse que les coenzymes inhibent certaines réactions ou bien que la présence de nicotinamide soit nécessaire pour éviter leur destruction enzymatique. Mann et Quastel (1941) ont en effet mis en évidence une inhibition de la succino-déshydrogénase du cœur de porc et du cerveau par la cozymase (nous avons pris connaissance de ce travail par une analyse et nous n'avons pu consulter le mémoire original). Par ailleurs, d'après ces auteurs, la nicotinamide entre en compétition avec la cozymase pour la coenzyme-nucléotidase qui existe dans divers tissus animaux : foie, rein, muscle, cerveau, etc. Il est donc possible qu'un certain équilibre soit nécessaire dans les cellules entre les coenzymes et la nicotinamide. Nous avons recherché si l'addition de vitamine P. P. à la cozymase augmentait son efficacité en tant que facteur de croissance pour *Proteus*. Deux expériences ont donné des résultats négatifs : la croissance en présence de cozymase additionnée d'acide ou d'amide nicotinique a été la somme des croissances respectives en présence d'une seule de ces substances (tableau XIX).

Pour ce qui concerne le *Proteus*, nous avons vérifié que le mauvais rendement de la croissance en présence de cozymase n'était pas dû à une utilisation lente : la croissance est terminée au bout de 48 heures, comme pour les cultures effectuées en présence d'acide nicotinique.

Tableau XIX

ASSIMILATION DE LA COZYMASE EN PRÉSENCE D'ACIDE OU D'AMIDE NICOTINIQUE

	Densité optique mesurée (1)	Somme des densités opti- ques des constituants	Densité optique théorique correspondant à la nicotinamide totale (2)
A. 1 cm ³ cozymase $0,9 \times 10^{-6}$	61		112
B. 1 cm ³ acide nicotinique 1×10^{-2}	64		65
C. 0,5 cm ³ » » ..	32		
D. 0,1 cm ³ » » ..	6,5		
A + B	119	129	177
A + C	90	93	144
A + D	71,5	67,5	118,5
A. 0,5 cm ³ cozymase $0,9 \times 10^{-6}$..	30		60
B. 1 cm ³ amide nicotinique 1×10^{-7} (environ).	77		
C. 0,8 cm ³ » »	62		
D. 0,5 cm ³ » »	38		
A + B	109	107	137
A + C	83	92	122
A + D	66	68	98

(1) Développement de *Proteus vulgaris*.

(2) Développement que l'on devrait obtenir si toute la nicotinamide de la cozymase était assimilée.

Nous pouvons donc tirer les conclusions suivantes de l'ensemble de ces données :

1° le défaut d'utilisation de la nicotinamide des coenzymes par *Proteus vulgaris* n'est pas dû à leur destruction par une nucléotidase microbienne puisque la nicotinamide est sans action sur le rendement de l'utilisation, à moins que cette nucléotidase ne soit pas inhibée par la nicotinamide ;

2° l'hypothèse de Saunders, Dorfman et Koser d'après laquelle la nicotinamide aurait un autre rôle que celui de constituant des coenzymes I et II semble difficile à admettre ; si, en effet, il intervenait dans le métabolisme de *Proteus vulgaris* un autre coenzyme qui serait synthétisé à partir de l'acide ou de l'amide nicotinique plus facilement qu'à partir des coenzymes I et II, l'addition de nicotinamide aux coenzymes devrait augmenter le rendement de leur utilisation ; nous avons vu qu'il n'en était rien ;

3° on pourrait supposer que les coenzymes fournis à la bactérie subissent une transformation enzymatique qui aboutirait à un dérivé

pyridinique moins actif que la nicotinamide comme par exemple l'acide glycylnicotinique.

On peut utilement comparer les données de la physiologie microbienne avec les renseignements concernant les tissus des mammifères. D'après les dosages de Kohn (1938), Axelrod, Spies et Elvehjem (1940), Pittman et Fraser (1941), Handler et Dann (1941), toute la nicotinamide du sang, du rein, du muscle, se trouverait combinée sous forme des coenzymes I et II. Un seul organe semble jusqu'ici faire exception : le foie qui renferme une proportion importante de nicotinamide non combinée. La signification de cette nicotinamide « libre » échappe pour le moment complètement. On ignore si elle possède une fonction particulière ou si elle ne constitue pas simplement une réserve de vitamine P. P. La nicotinamide combinée sous forme des coenzymes I et II est en tous cas la seule forme active connue de la vitamine P. P.

Il est donc très difficile pour le moment d'interpréter la différence d'activité entre la nicotinamide et les coenzymes; en tout cas il ne nous semble pas que l'on soit autorisé à conclure que la nicotinamide entre dans la constitution d'autres composés que les phospho-pyridino-nucléotides.

CHAPITRE VII

RÉACTIONS DU PROTEUS A QUELQUES DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE

Aussitôt découvert le rôle de la nicotinamide en tant que vitamine pour l'homme, le chien et les microorganismes, la question de sa spécificité s'est posée.

La valeur curative de nombreux dérivés pyridiniques vis-à-vis de la pellagre a été étudiée par Spies, Cooper et Blankenhorn ; Spies, Bean et Stone ; Vilter et Spies, et enfin Bills, Mac Donald et Spies. La spécificité vis-à-vis de la black-tongue du chien est établie par Elvehjem, Mac Kibbin et Elvehjem et surtout Wooley, Strong, Madden et Elvehjem.

L'action des nombreux dérivés pyridiniques sur la croissance des bactéries a été examinée par Knight et Mac Ilwain, et par Landy pour *Staphylococcus aureus*, par Dorfman et ses collaborateurs pour les bacilles dysentériques et par Lwoff et Querido (1939), puis Pelczar et Porter, Möller et Birkofer pour *Proteus vulgaris*. Certains bacilles lactiques : *Lactobacillus arabinosus* (Snell et Wright) et *Streptobacterium plantarum* (Möller et Birkofer) ont aussi été envisagés du point de vue de leur réponse aux dérivés de l'acide nicotinique.

Nous discuterons d'abord la spécificité de la nicotinamide en tant que facteur de croissance pour *Proteus vulgaris*, puis nous comparerons les résultats à ceux obtenus avec d'autres bactéries. Enfin nous confronterons les conclusions avec celles relatives à la valeur des substances douées d'activité vitaminique vis-à-vis de l'homme et du chien ; nous pourrions ainsi nous faire une idée de la valeur absolue et relative du test microbien choisi.

TECHNIQUES

Cette étude doit être faite avec un milieu synthétique convenablement choisi dans lequel le microbe se développe bien en présence d'amide nicotinique et qui ne permette aucune croissance en son absence. Même si la culture souche utilisée est entretenue en milieu synthétique, il est toujours bon d'effectuer des repiquages en série, pour être certain que toute trace de facteur de croissance amené par l'ensemencement est éliminée et que c'est bien le corps en expérience qui permet le développement bactérien observé. Nous allons examiner en détail les techniques utilisées par différents auteurs pour l'étude de *Proteus vulgaris*.

Technique de Lwoff et Querido. — Lwoff et Querido ont employé le milieu à base de sulfate de NH_4 et de glucose indiqué précédemment. Dans ce milieu non additionné de facteur de croissance, on n'observe — à condition que le glucose soit pur — aucun développement de *Proteus vulgaris*.

Les substances étudiées sont stérilisées par filtration sur bougie Chamberland L₃. Pour la majorité de ces dérivés ces auteurs ont vérifié que les solutions stérilisées à 120° se comportaient de la même façon que les solutions filtrées, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de cause d'erreur inhérente à la filtration sur bougie. Par ailleurs, pour toutes les substances inactives, une épreuve de toxicité a été pratiquée. Ajoutons que Lwoff et Querido ont toujours effectué leurs expériences en ensemençant avec une souche entretenue en milieu synthétique, en présence d'une faible quantité d'amide nicotinique. Dans ces conditions, le témoin sans facteur de croissance ne présente qu'un développement nul ou négligeable. Ces auteurs ont pris comme critérium d'activité d'une substance la dilution la plus faible qui donne une culture visible. C'est la technique que nous avons utilisée.

Technique de Möller et Birkofer. — Möller et Birkofer emploient un milieu plus complexe, contenant en particulier le mélange d'acides aminés dont la formule est donnée à la page 17, de l'acide pantothénique et de l'acide *p*-aminobenzoïque. Leurs tubes d'expérience sont ensemencés directement à partir d'une souche de 24 heures en bouillon glucosé. L'ensemencement est effectué avec une anse de platine qui apporte très peu de liquide, mais cette faible quantité peut cependant introduire des traces de facteur de croissance dans le milieu. Ces auteurs ne signalent jamais avoir effectué des repiquages en série en milieu synthétique en présence des substances étudiées. Möller et Birkofer ont aussi établi les dilutions limites permettant un développe-

ment visible de *Proteus vulgaris*; mais ils trouvent que cette valeur peut osciller suivant les expériences d'une façon notable; par ailleurs, la concentration permettant une croissance maxima est aussi mal définie. Les auteurs allemands préconisent de définir l'activité d'un composé pyridinique par la concentration de cette substance qui permet un développement bactérien moitié du développement maximum. Tous les autres auteurs ont adopté le test de croissance minima visible. Pour notre étude comparative, nous ne retiendrons, du travail de Möller et Birkofer, que les données se rapportant à cette croissance minima.

Technique de Pelczar et Porter. — Pelczar et Porter ont utilisé, pour leurs expériences, le milieu de Fildes à base de lactate de sodium. L'ensemencement est pratiqué avec un fil de platine, à partir d'une culture sur gélose. Après 48 heures d'incubation à 37°, à partir des tubes montrant une culture abondante, 5 repiquages en série en milieu synthétique sont effectués. Malheureusement ces auteurs n'indiquent pas les concentrations des substances employées, et leurs résultats par conséquent ne peuvent avoir qu'une valeur qualitative pour les corps actifs, et peuvent être mis en doute pour les corps inactifs. Par ailleurs Pelczar et Porter ne précisent pas s'ils ont utilisé le test de croissance maxima ou minima.

SPÉCIFICITÉ DE LA NICOTINAMIDE

1. *Proteus vulgaris* réagit exactement de la même façon à l'acide et à l'amide nicotinique; comme on le verra, ceci n'est pas le cas pour toutes les bactéries. Fildes (1938) avait noté que *Proteus* pouvait aussi se multiplier en présence d'acide nicotinique et de cozymase; mais il n'avait fait aucune mesure précise. Lwoff et Querido (1938) établissant un dosage de l'amide nicotinique à l'aide du test *Proteus* ont pu montrer quantitativement d'une manière très précise que l'acide et l'amide nicotinique avaient la même activité pour la croissance de cette bactérie — ce que nous avons vérifié au cours de nombreuses expériences.

2. Lorsqu'on introduit de l'acide nicotinique dans des milieux de culture tamponnés, il se trouve nécessairement sous la forme de sel de Na, K ou NH₄ suivant la constitution du milieu employé; la constatation de Pelczar et Porter suivant laquelle les nicotinales de NH₄ et de Na sont aussi actifs que l'acide nicotinique semble donc évidente *a priori*.

L'ester éthylique est 50 fois moins actif (Lwoff et Querido). D'après Pelczar et Porter, il serait aussi actif que l'amide nicotinique. D'après

Möller et Birkofer, l'activité de l'ester méthylique est variable avec le pH : à pH 7,8 il est environ 7 fois plus actif qu'à pH 7,2, pH auquel il a la même activité que l'acide nicotinique. Nous avons constaté en effet que le développement des cultures de *Proteus vulgaris* effectuées en présence d'ester méthylique est variable avec le pH, mais dans tous les cas, il est plus faible que celui obtenu avec une quantité équivalente de nicotinamide. A pH 7,1 l'ester méthylique est 10 fois moins actif, à pH 7,9 il est encore 3,5 fois moins actif que l'acide nicotinique.

3. Des substitutions sur l'azote de la fonction amide diminuent l'activité ; la diéthylamide (coramine) est 1 000 fois moins active que l'amide nicotinique (Lwoff et Querido, Möller et Birkofer). Pelczar et Porter, au contraire, ont trouvé que la monoéthylamide et la diéthylamide avaient la même activité que l'amide nicotinique non substituée. Nous avons vu que la technique utilisée par ces auteurs est critiquable ; par ailleurs, ils ne donnent aucun critérium de pureté des produits employés qui pouvaient être souillés par des traces d'acide ou d'amide nicotinique. Ces résultats sont du reste en contradiction, nous le verrons plus loin, avec ceux obtenus par Dorfman et ses collaborateurs avec le bacille dysentérique.

4. Les isomères de l'acide nicotinique : l'acide pyridine-2-carboxylique ou picolinique n'a montré aucune action (Lwoff et Querido ; Pelczar et Porter ; Möller et Birkofer) tandis que l'acide pyridine-4-carboxylique ou isonicotinique a une légère action à très forte concentration : 10 000 fois plus grande que celle de l'acide nicotinique (Lwoff et Querido).

5. *Substitutions dans le noyau.* — a) La méthylation en 6, 2 et 4 ou 2 et 6 fait disparaître complètement l'activité : les 6-méthyl et 2-6-diméthylnicotinamide (Möller et Birkofer) et l'acide 2-4-diméthylpyridine-3-carboxylique (Lwoff et Querido) sont dépourvus d'action.

b) La 2-acétylnicotinamide et l'acide 2-amino-pyridine-3-carboxylique sont également inactifs (Möller et Birkofer).

c) La substitution d'un deuxième groupement carboxyle entraîne une diminution plus ou moins considérable de l'activité : l'acide quinolinique ou acide pyridine-2-3-dicarboxylique (Lwoff et Querido) est 10 000 fois moins actif que l'acide nicotinique. Pelczar et Porter l'ont trouvé complètement inactif, mais ils n'indiquent pas la concentration employée.

d) D'après Pelczar et Porter l'acide pyridine-3-aminoacétique serait aussi actif que l'acide nicotinique. Mais nous avons vu que les résultats donnés par ces auteurs peuvent être mis en doute.

6. La pyridine n'a absolument aucune action (Lwoff et Querido).

7. Pyridines β -substituées par un radical autre que COOH.

La β -picoline ou 3-méthylpyridine est très légèrement active (10 000 fois moins que l'acide nicotinique) (Lwoff et Querido).

Le pyridine-3-nitrile a la même activité que la β -picoline (Lwoff et Querido).

L'acide nicotinurique (nicotinyglycine) est actif à la concentration de $M \times 10^{-6}$ pour la croissance de *Proteus* (Lwoff et Querido). En fait, C. Lataste a constaté que pour une concentration de $M \times 10^{-5}$ de cette substance dans le milieu, la densité optique des cultures obtenues était 165 fois moins grande que pour une quantité équimoléculaire de nicotinamide. D'après Pelczar et Porter, l'acide nicotinurique serait aussi actif que l'acide nicotinique pour *Proteus vulgaris*.

La nicotine. — Möller et Birkofer ont trouvé que pour *Proteus vulgaris* la nicotine à la concentration de $M \times 10^{-5}$ pouvait remplacer l'acide nicotinique. Ces auteurs utilisaient la nicotine « Merck purissim », repurifiée. Après l'extraction à l'éther, 1/4 de l'activité disparaît, mais toutes les autres purifications tentées ont conservé intacte l'activité résiduelle. Les auteurs allemands considèrent qu'il reste malgré tout douteux que les bactéries puissent utiliser la nicotine. Cette substance est très sensible à l'action de la lumière et de l'oxygène, mais cependant peut difficilement libérer des quantités massives d'acide nicotinique ou de produits intermédiaires actifs (Rayburn, Harlan, Hanmer, 1941). Cependant, il faut penser avec Möller et Birkoffer qu'une préparation absolument pure de nicotine dans les conditions d'un test bactérien (présence de Fe, O₂, formation d'H₂O₂ pendant la croissance) ne peut rester absolument intacte.

Les dérivés β -sulfonés de la pyridine seront étudiés dans un paragraphe spécial.

8. *Substitutions portant sur l'azote pyridinique.* — Les méthylchlorures de nicotinamide et d'acide nicotinique (Lwoff et Querido) ont une certaine activité : 100 fois plus faible que celle de l'acide nicotinique. Le méthylsulfate de l'acide nicotinique (Lwoff et Querido) est inactif. Il est intéressant de noter que le méthyliodure de nicotinamide est pratiquement inactif pour la croissance de *Proteus vulgaris*, 10 000 fois moins que l'acide (Möller et Birkofer). Rappelons que cette substance a été utilisée par Karrer et Warburg comme modèle pour établir sur quelle valence de l'azote pyridinique se faisait l'oxydation réversible de la nicotinamide des coenzymes.

9. La trigonelline (Pelczar et Porter) est inactive. Nous avons voulu vérifier ce résultat et nous avons constaté que la trigonelline était 200 000 fois moins active que l'acide nicotinique. L'échantillon utilisé était la trigonelline du commerce non repurifiée et cette légère activité peut être due à des traces d'acide nicotinique. Ceci est très important, nous le verrons, au point de vue du dosage de l'acide nicotinique dans l'urine et dans les végétaux.

10. L'acide 2-4-6-triméthylpyridine-3-5-dicarboxylique est inactif (Lwoff et Querido).

11. *Noyau pyrazinique.* — Avec Mme Th. Tréfeuël (in Justin-

Besançon et Lwoff), nous avons trouvé que l'acide pyrazine-3-carboxylique qui diffère de l'acide nicotinique en ce que le carbone en position 4 du noyau pyridinique est remplacé par un deuxième atome d'azote, ne pouvait pas remplacer l'acide nicotinique pour la croissance de *Proteus vulgaris* même à la concentration de $0,5 \times 10^{-2}$ M dans le milieu de culture. Des résultats identiques ont été obtenus par Möller et Birkofer aussi bien pour *Proteus vulgaris* que pour *Streptobacterium plantarum*.

Par ailleurs, les dérivés pyraziniques ne peuvent remplacer la nicotinamide des codéshydrogénases ni pour le métabolisme anaérobie, ni pour la respiration : en effet, nous avons ajouté de la pyrazine (2×10^{-4}) à des cultures carencées de *Proteus* et nous avons constaté, suivant la technique déjà décrite, qu'il n'y avait aucune augmentation de la vitesse de réduction du bleu de méthylène dans les tubes de Thunberg. La pyrazine est aussi incapable de rétablir la respiration des cultures de *Proteus vulgaris* carencées en nicotinamide.

12. *Dérivés du thiazol.* — Schmelkes ayant constaté que l'acide thiazol-5-carboxylique était isostère de l'acide nicotinique a suggéré qu'il pouvait peut-être remplacer ce corps en tant que facteur de croissance; en fait, il est faiblement actif pour les bacilles dysentériques. Depuis, Möller et Birkofer ont étudié son action sur la croissance de *Proteus vulgaris* : ils ont constaté une activité à la concentration de $M \times 10^{-3}$, activité 10 000 fois inférieure à celle de l'acide nicotinique. Même avec des concentrations plus fortes ils n'obtiennent jamais de culture aussi abondante qu'avec l'acide ou l'amide nicotinique. Avec Mme Th. Tréfeuël nous avons étudié ce corps; en présence d'une concentration de $0,7 \times 10^{-2}$ M d'acide thiazol-5-carboxylique, nous avons pu obtenir des cultures en série (10 repiquages) de *Proteus vulgaris*. En présence de 5 mgr de cette substance pour 5 cm³ de milieu, le développement bactérien correspond à celui que l'on obtiendrait en présence d'une quantité 62.000 fois plus faible de nicotinamide. On peut admettre que certains dérivés de la pyridine peu actifs soient transformés lentement ou avec un très mauvais rendement en acide nicotinique. Cette transformation semble impossible à admettre pour ce qui concerne l'acide thiazol-5-carboxylique et on peut se demander si celui-ci ne prendrait pas vraiment la place de l'amide nicotinique dans la molécule des coenzymes I et II.

13. *Noyau quinoléine.* — Si on accole un noyau benzénique à la pyridine (noyau de la quinoléine), on obtient des composés absolument dépourvus d'activité. Möller et Birkofer ont essayé sans succès les acides quinoléine- α - et β carboxyliques.

14. Ces mêmes auteurs ont étudié aussi certains dérivés de l'acide nicotinique où un oxygène de la fonction acide est remplacé par un atome de soufre. Ils ont constaté d'abord qu'il fallait seulement 20 fois plus de thionicotinamide autoclavée que de nicotinamide pour obtenir

la croissance maxima du *Proteus*. Mais si la thionicotinamide est filtrée au lieu d'être stérilisée à l'autoclave avec la solution de base, son activité est plus faible. Comme par ailleurs, Möller et Birkofer constatent que ce corps, spécialement en présence de fer, perd facilement son soufre, on peut se demander si la thionicotinamide est réellement la substance active, et en tout cas si son activité n'est pas beaucoup plus faible que celle que lui attribuent ces auteurs.

L'acide thiopicolinique est inactif.

15. *Dérivés sulfonés de l'acide et de l'amide nicotinique.* — L'acide pyridine- β -sulfonique avait été étudié par Lwoff et Querido (1939) qui avaient obtenu un développement bactérien avec une concentration de $M \times 10^{-5}$, c'est-à-dire 1 000 fois supérieure à celle de l'acide nicotinique. Avec le même échantillon, Knight et Mac Ilwain n'avaient pu obtenir de cultures de *Staphylococcus aureus*. Möller et Birkofer reprennent la question des dérivés β -sulfonés de la pyridine et obtiennent un développement de *Proteus vulgaris* (et *Streptobacterium plantarum*) avec l'acide pyridine- β -sulfonique, son amide, le méthyl-iodure et la diéthylamide de l'acide pyridine- β -sulfonique (S-coramine); mais avec des concentrations comprises entre 1 et 2×10^{-2} , c'est-à-dire très supérieures à celle indiquée par Lwoff et Querido. Pour Möller et Birkofer, le méthyl-iodure est plus actif que l'amide, tandis qu'on observe le contraire pour les composés carbonés correspondants. Mais les expériences de Möller et Birkofer ne sont pas à l'abri de toute critique, nous l'avons vu à propos des techniques d'étude de la spécificité et il faut ajouter ici que le milieu employé par ces auteurs peut être souillé par des traces d'acide nicotinique, amené soit par un des nombreux constituants, soit par les dérivés sulfonés eux-mêmes.

Nous avons eu depuis l'occasion d'essayer une nouvelle préparation d'acide pyridine- β -sulfonique, et nous n'avons jamais pu obtenir aucune croissance de *Proteus vulgaris* au deuxième repiquage en présence de ce dérivé, quelle que soit la concentration employée, jusqu'à 1 pour 500. Notons aussi que l'acide pyridine- β -sulfonique est inactif pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain), pour le bacille dysentérique (Dorfman, Koser et Saunders) et pour le chien (Wooley, Strong, Madden et Elvehjem).

Nous pouvons donc conclure que les dérivés β -sulfonés de la pyridine ne sont pas capables de remplacer l'acide nicotinique comme facteur de croissance. Mais ces composés peuvent être envisagés d'un autre point de vue. On sait aujourd'hui après les travaux de Fildes et Woods, que certains dérivés sulfonés sont antagonistes des acides carboxyliques correspondants : la *p*-aminobenzène sulfamide est antagoniste de l'acide para-aminobenzoïque qui est un facteur de croissance pour certains microorganismes, un *métabolite essentiel* (au sens de Fildes) pour d'autres. On pouvait se demander si l'amide de l'acide pyridine- β -sulfonique ne serait pas antagoniste de l'acide pyridine-

β -carboxylique. Cette question a été examinée par Matti, Nitti, Morel et Lwoff (1941). Aucune action inhibitrice n'a été observée sur le flagellé *Polytomella exca* ni sur les bactéries *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*. Ce dernier a été étudié en présence de dilutions limites efficaces d'acide nicotinique. La concentration maximum d'acide pyridine- β -sulfonique a été de 1 pour 500. D'autres auteurs ont repris cette question. Erlenmeyer et Würgler (1942) ont observé une action inhibitrice de l'acide pyridine- β -sulfonique pour *Proteus vulgaris* entre les concentrations de 4×10^{-3} M (c'est-à-dire sensiblement 0,6 o/oo) inhibition nette, et 4×10^{-5} M (soit 0,6 pour 100 000) inhibition légère. D'après ces auteurs, l'action antagoniste serait supprimée par l'acide nicotinique à la concentration de 1×10^{-3} M. Möller et Birkofer n'ont observé une action inhibitrice de l'acide pyridine- β -sulfonique sur *Proteus vulgaris* que pour une concentration de 1 o/o. Il est difficile de tirer une conclusion de ces résultats assez discordants. Il faut en tout cas remarquer que des corps physiologiques comme l'acide nicotinique lui-même peuvent exercer une action inhibitrice à très forte concentration. Il convient donc d'être très prudent pour interpréter l'inhibition obtenue avec une concentration élevée d'un corps. Il faut aussi ne pas oublier que l'acide pyridine- β -sulfonique préparé par la méthode de Machek (1939) peut, s'il n'est pas très soigneusement purifié, contenir des quantités de mercure faibles, mais suffisantes cependant pour exercer une action inhibitrice.

On voit donc que *Proteus vulgaris* ne réagit pas d'une façon spécifique à l'acide ou à l'amide nicotinique. Certains dérivés de la pyridine peuvent être actifs, mais beaucoup moins (1 000 à 10 000 fois moins) que la vitamine P. P.. Pour ce qui concerne le dosage de cette vitamine, les erreurs dues à la présence possible de ces substances dans les milieux étudiés sont donc extrêmement faibles. D'autre part, nous le verrons, le *Proteus* réagit dans l'ensemble aux dérivés de l'acide nicotinique comme l'homme et le chien.

CHAPITRE VIII

RÉACTION DE DIVERSES BACTÉRIES AUX DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE ET AUX COENZYMES I ET II

Le problème du degré de spécificité de l'acide nicotinique et de ses dérivés considérés comme facteurs de croissance pour diverses bactéries mérite d'être longuement discuté. L'examen de cette question nous conduira en effet à deux conclusions :

a) Les diverses espèces peuvent se comporter de façon différente vis-à-vis des mêmes composés ;

b) Malgré cette diversité, on peut dégager des lois générales relatives au rapport entre la structure des composés et leur activité en tant que facteur de croissance.

Dans l'ensemble, les quelques bactéries étudiées et le *Proteus* répondent d'une manière tout à fait analogue aux dérivés pyridiniques. Il faut cependant signaler certaines différences qui sont d'une grande importance au point de vue du dosage des composés pyridiniques à l'aide des divers tests microbiens. Nous envisagerons d'abord l'activité comparée de l'acide nicotinique, de son amide et des coenzymes I et II, puis de quelques dérivés de l'acide nicotinique.

ACTIVITÉ DE L'ACIDE NICOTINIQUE, DE LA NICOTINAMIDE ET DES COENZYMES I ET II

Les besoins comparés en nicotinamide et en acide nicotinique pour les différentes espèces microbiennes sont très variables. Knight et Mac Ilwain (1938) ont constaté que l'amide nicotinique est 5 fois plus active que l'acide correspondant pour *Staphylococcus aureus*. D'après Landy, il faudrait 10 fois moins d'amide que d'acide pour obtenir une culture visible chez cette même bactérie.

Pour Dorfman, Koser, Reames, Swingle et Saunders (1939), l'amide est plus active que l'acide vis-à-vis du bacille dysentérique; mais la différence observée est moins importante que celle indiquée par Knight et Mac Ilwain pour *Staphylococcus aureus*. Pour les bacilles dysentériques, elle porte surtout sur la vitesse de croissance ou de départ des cultures effectuées en présence de faibles quantités d'acide ou d'amide nicotinique. Si les résultats sont notés après 24 heures d'incubation, l'acide semble 10 fois moins actif que l'amide. Mais, en fait, en présence d'une faible concentration d'acide nicotinique, les cultures n'atteignent leur développement maximum qu'après 4 à 7 jours d'incubation; si les résultats sont notés à ce moment, on constate que l'activité de l'amide n'est que 2 à 3 fois plus élevée que celle de l'acide. Le retard dans le développement est dû sans doute à la transformation lente de l'acide en amide par les bactéries, celles-ci ne pouvant utiliser que l'amide pour leur métabolisme. Remarquons que, dans les expériences de Knight et Mac Ilwain sur la croissance de *Staphylococcus aureus*, les cultures sont examinées après 48 heures et il est possible qu'un phénomène analogue à celui observé par Dorfman pour le bacille dysentérique puisse intervenir.

Nous avons vu que chez *Proteus vulgaris*, le développement obtenu est le même en présence d'acide ou d'amide nicotinique (Lwoff et Querido). Les bactéries lactiques : *Streptobacterium plantarum* (Möller et Birkofer) et *Lactobacillus arabinosus* (Snell et Wright) se comportent de la même façon.

Il faut noter que Howard Mueller en 1937 a montré que l'acide nicotinique et son amide stimulaient la croissance du bacille diphtérique, ces substances n'étant toutefois pas indispensables à la multiplication microbienne, et que dans ce cas, l'acide serait 10 fois plus actif que l'amide. P. Bordet en 1939 confirme ces résultats et montre que l'acide nicotinique augmente aussi considérablement la toxigenèse en présence de sucre. Il constate que la cozymase purifiée ne favorise nullement le développement et vérifie que l'action de l'amide nicotinique est, sinon certainement nulle, du moins douteuse, et, en tout cas, considérablement inférieure à celle de l'acide nicotinique. Ces résultats concernant le bacille diphtérique s'opposent à ceux obtenus avec les autres bactéries étudiées. Par contre, récemment, Koser, Berkman et Dorfman (1941) ont étudié une bactérie, *Pasteurella suisseptica*, qui ne peut se multiplier qu'en présence d'amide nicotinique à l'exclusion de l'acide (nous avons eu connaissance de ce travail d'après une analyse et il nous a été impossible de consulter le mémoire original).

Nous avons vu que, jusqu'ici, on ne connaît à la nicotinamide d'autre rôle que celui de constituant des coenzymes I et II et que l'on peut supposer que les bactéries utilisent l'acide ou l'amide nicotinique endogène ou exogène pour la synthèse de ces coenzymes. La question se pose alors des modalités de la synthèse des coenzymes. Les diffé-

rences d'activité des divers dérivés de la pyridine pourraient tenir :
 a) à la facilité avec laquelle ils sont transformés en amide nicotinique;
 b) à la façon dont l'amide est engagée dans les combinaisons qui sont utilisées pour la construction des coenzymes I et II.

Avant de discuter ce problème, il est nécessaire d'étudier l'activité des coenzymes en tant que facteur de croissance. Cette question a été examinée du point de vue du *Proteus* dans un chapitre précédent. Knight a constaté qu'une préparation de cozymase était très active pour *Staphylococcus aureus* mais il n'a pas fait de déterminations quantitatives. Le coenzyme II n'a pas été étudié. Dorfman, Koser, Horwitt, Berkman et Saunders observent que le coenzyme II est moins actif pour *Shigella dysenteriae* que le coenzyme I, lui-même moins actif que l'acide nicotinique. Pour des mesures précises, ces auteurs utilisent, non pas le test de croissance quantitative, mais le dosage de l'acide lactique formé dans le milieu de culture en présence de glucose. L'acide est simplement titré par de la soude en présence de bleu de bromothymol. La quantité d'acide lactique formé en présence de cozymase (coenzyme I), et surtout de coenzyme II, est beaucoup plus faible que celle obtenue en présence d'une quantité équimoléculaire d'amide nicotinique. Le rapport de l'activité de l'amide nicotinique au coenzyme I est environ 1,8 et au coenzyme II : 3,7. Les solutions de coenzymes, autoclavées (à « 20 livres » — soit 109° — pendant 30 minutes) se montrent plus actives que les solutions filtrées; et il est possible par un chauffage convenable, disent ces auteurs, d'amener l'activité des solutions de coenzymes à celle d'une quantité théoriquement équivalente de nicotinamide. Si les mesures de l'acidification du milieu, sont faites après un temps d'incubation suffisamment long, l'activité de l'acide nicotinique est sensiblement la même que celle de l'amide. Les cultures effectuées en présence de coenzymes présentent une *lag phase* analogue à celle qu'on observe en présence d'acide nicotinique. Saunders, Dorfman et Koser (1941) ont étudié la respiration du bacille dysentérique carencé en nicotinamide. En présence de glucose, la nicotinamide est plus active que les coenzymes I et II. Etudiant *Streptobacterium plantarum*, Möller et Birkofer trouvent que la cozymase est légèrement moins active que l'amide et l'acide nicotinique. Le coenzyme II n'a pas été étudié. Pour *Proteus vulgaris*, nous venons de voir que le coenzyme I et peut-être le coenzyme II ne permettent pas le même développement bactérien qu'une quantité équivalente d'acide nicotinique. D'après Snell et Wright, la cozymase a la même activité pour *Lactobacillus arabinosus* que l'acide nicotinique correspondant. Par ailleurs, dans le cas du bacille diphtérique, P. Bordet a trouvé que la cozymase n'avait aucune action sur la croissance. Le coenzyme II n'a pas été étudié. Le tableau ci-contre résume nos connaissances sur les activités relatives de l'amide, de l'acide nicotinique et des deux coenzymes. Il résulte de l'ensemble des données

Tableau XX

ACTIVITÉ COMPARÉE DE L'ACIDE ET DE L'AMIDE NICOTINIQUE
ET DES COENZYMES I ET II POUR QUELQUES BACTÉRIES

	Nicotin- amide	Acide nicoti- nique	Coen- zyme I	Coen- zyme II
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	+++	+++	+++	p
<i>Streptobacterium plantarum</i>	+++	+++	++	p
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	actif (1)	
<i>Proteus vulgaris</i>	+++	+++	++	++ (2)
<i>Shigella dysenteriae</i>	+++	++±	++	+
<i>Pasteurella suiseplica</i>	+++	o	p	p
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (3).....	± (p)	+++	o	p

(1) Le coenzyme I est actif mais il n'a pas été fait de comparaison quantitative de son activité avec celle de l'amide et de l'acide nicotinique.

(2) L'activité relative des deux coenzymes n'a pas été étudiée.

(3) Les substances sont des stimulants et non des facteurs de croissance.

actuellement acquises que l'action quantitative de l'acide nicotinique, de son amide et des coenzymes peut différer d'un organisme à l'autre.

La façon dont les organismes réalisent la synthèse des coenzymes reste entièrement hypothétique. Nous avons vu cependant dans un chapitre précédent que l'on pouvait envisager que *Proteus vulgaris* ne puisse pas utiliser intégralement le nucléoside amide nicotinique-ribose. Si cette manière de voir est exacte, la soudure de l'amide nicotinique ne se ferait que lorsque le ribose est déjà engagé dans une combinaison.

Une digression est ici nécessaire. Le groupement thiazolique de la vitamine B₁ est le 4-méthyl-5-hydroxy-éthyl-thiazol. Bonner et Erickson ont proposé au *Phycomyces* d'autres dérivés thiazoliques : ceux qui permettent la croissance sont transformés en 4-méthyl-5-hydroxy-éthyl-thiazol. Des résultats analogues ont été obtenus avec des dérivés pyridiniques différents de la pyridine « naturelle » de la vitamine B₁. On doit semble-t-il admettre d'une manière générale que les dérivés des diverses vitamines ne sont capables d'agir qu'après transformation dans la vitamine spécifique correspondante. Cette hypothèse est appuyée par tout ce que l'on sait sur la spécificité des coenzymes. Une réserve doit être faite pour les substances isostères (v. p. 60).

Si on admet alors que la nicotinamide est le seul dérivé pyridinique susceptible de figurer dans la molécule des coenzymes la possibilité d'utilisation de telle ou telle substance dépendra de la possibilité de sa

transformation en nicotinamide. On comprendrait alors qu'il puisse exister des différences de vitesse de croissance en présence de divers composés. Si le rendement de la transformation est de 100 0/0 et si cette transformation est suffisamment rapide, la croissance finale doit être la même. Les différences quantitatives entre l'action de l'acide et de l'amide nicotinique pourraient tenir à la plus ou moins grande facilité de la transformation de l'acide en amide, celle-ci étant seule utilisable pour la synthèse des coenzymes. On peut donc admettre que pour le bacille dysentérique la *lag phase* observée en présence d'une faible quantité d'acide nicotinique est due au temps nécessaire pour la transformation acide $\rightarrow$ amide. *Pasteurella suisceptica* serait incapable de transformer l'acide en amide.

ACTIVITÉ DE QUELQUES DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE

Pour le bacille dysentérique, les différents esters de l'acide nicotinique peuvent se ranger ainsi par ordre d'activité décroissante : l'ester méthylrique qui est aussi actif que l'amide, par conséquent 3 fois plus actif que l'acide libre ; l'ester éthyrique, 10 fois moins actif que la nicotinamide ; l'activité diminue encore pour les esters propyrique et butyrique (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

Pour *Streptobacterium plantarum* (Möller et Birkofer) l'ester méthylrique serait moins actif que l'amide et l'acide nicotinique et son activité serait indépendante du pH. En présence d'ester méthylrique, *Staphylococcus aureus* (Knight) présente une *lag phase* prolongée, mais la croissance finale est la même qu'en présence d'acide nicotinique.

Toutes les bactéries semblent se comporter comme le *Proteus* à l'égard de l'éthyl- et de la diéthylamide de l'acide nicotinique qui sont moins actives que la nicotinamide. La méthylamide a la même activité que l'éthylamide pour *Shigella dysenteriae* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

Les isomères de l'acide nicotinique sont inactifs pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain), et pour *Shigella dysenteriae* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

Les dérivés ayant un groupement méthyle substitué dans le noyau sont inactifs pour les bacilles dysentériques (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

L'acide dinicotinique est inactif. L'acide quinolinique permet une légère croissance du bacille dysentérique qui pourrait cependant être due à des impuretés (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders) mais n'a aucune action sur celle de *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain). L'acide cinchoméronique est inactif pour le bacille dysentérique (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

Tableau XXI

LES DÉRIVÉS DE L'ACIDE NICOTINIQUE, FACTEURS DE CROISSANCE POUR LES BACTÉRIES

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacilles dysentériques</i> (1)	<i>Proteus vulgaris</i> (2)	<i>Streptobacterium plantarum</i> (3)
Acide nicotinique	$+0,7 \times 10^{-7}$ (K. L.)	$+3 \times 10^{-8}$	$+1 \times 10^{-8}$ (F.)	$+4 \times 10^{-8}$
Amide de l'acide nicotinique.....	$+1 \times 10^{-8}$ (K. Kl. L.)	$+1 \times 10^{-8}$	$+1,8 \times 10^{-8}$ (M. B.)	$+6,5 \times 10^{-8}$
Nicotinate de sodium	$+0,7 \times 10^{-7}$ (L.)		$+1 \times 10^{-8}$ (F.)	
» d'ammonium	$+1,5 \times 10^{-7}$ (L.)		$+1,8 \times 10^{-8}$ (M. B.)	
» de méthyle	$+5 \times 10^{-7}$ (Kl. L.)		$+$ (P.)	
» d'éthyle	$+0,7 \times 10^{-6}$	$+1 \times 10^{-8}$	$+$ (P.)	
» de propyle		$+1 \times 10^{-7}$	$+0,5 \times 10^{-8}$ pH 7,8 (M. B.)	
» de butyle.....		$+1 \times 10^{-6}$	$+3,7 \times 10^{-8}$ pH 7,2	
» de glycine (acide nicotinurique)		$+1 \times 10^{-6}$	$+0,5 \times 10^{-6}$	$+3 \times 10^{-7}$
Méthylamide de l'acide nicotinique.....	$+1 \times 10^{-8}$ (L.)	$+1 \times 10^{-6}$	$+1 \times 10^{-6}$	
Ethylamide de l'acide nicotinique.....	$+0,35 \times 10^{-5}$ (L.)	$+1 \times 10^{-5}$		
Diéthylamide de l'acide nicotinique (coramine)	$0 \ 1 \times 10^{-5}$ (Kl. L.)	$+1 \times 10^{-5}$	$+$ (P.)	$+5,6 \times 10^{-4}$
Acide pyridine-2-carboxylique (picolinique)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$ (Kl. L.)	0	$+3,5 \times 10^{-4}$ (M. B.)	$0 \ 2,7 \times 10^{-3}$
» pyridine-4-carboxylique (isonicotinique)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$ (Kl. L.)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	
6-méthylnicotinamide		$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$+1 \times 10^{-4}$	
2-6-diméthylnicotinamide		$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$0 \ 0,6 \times 10^{-4}$ (M. B.)	
Acide diméthyl-2-4-pyridine-3-carboxylique			$0 \ 3,6 \times 10^{-2}$ (M. B.)	
2-acétylnicotinamide			$0 \ 1 \times 10^{-4}$	
Acide pyridine-2-amino-3-carboxylique	0 (L.)		$0 \ 1,6 \times 10^{-2}$ (M. B.)	
» pyridine-2-3-dicarboxylique (quinolinique)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$ (Kl.)		0 (P.)	
» pyridine-3-5-dicarboxylique (dinicotinique)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$+1 \times 10^{-4}$	$+1 \times 10^{-4}$	
» pyridine-3-4-dicarboxylique (cinchonérique)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	0 (P.)	
» triméthyl-2-4-6-pyridine-3-5-dicarboxylique	$0 \ 1 \times 10^{-4}$ (Kl.)	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	$0 \ 1 \times 10^{-4}$	
» triméthyl-2-4-6-pyridine-2,5-dicarboxylique			$0 \ 1 \times 10^{-4}$	

La pyridine est inactive pour toutes les bactéries étudiées (Knight et Mac Ilwain ; Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders).

Parmi les pyridines β -substituées par un radical autre que COOH :

a) la β -picoline est inactive,

b) la pyridine-3-nitrile, la β -aminopyridine, la β -acétylpyridine, l'éthyl-nicotino acétate sont inactifs (Landy, Knight et Mac Ilwain pour *Staphylococcus aureus* ; Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders, pour *Shigella dysenteriae*).

L'acide nicotinurique est 100 fois moins actif que la nicotinamide pour les bacilles dysentériques comme pour *Proteus vulgaris* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders). Par contre, pour *Staphylococcus aureus* (Landy) et pour *Lactobacillus arabinosus* (Snell et Wright), il est aussi actif que l'amide nicotinique.

La nicotine ne permet pas la croissance de *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain). Cette substance n'a pas été essayée pour les bacilles dysentériques, *Lactobacillus* et *Streptobacterium*.

Substitutions portant sur l'N pyridinique. — Le méthylchlorure de l'acide nicotinique est inactif pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain), et pour les bacilles dysentériques (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders). Le méthyliodure est inactif pour les bacilles dysentériques (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders) mais, d'après Möller et Birkofer, serait légèrement actif pour *Streptobacterium plantarum*.

La trigonelline n'a aucune action pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain), pour *Shigella dysenteriae* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders) ni pour *Lactobacillus arabinosus* (Snell et Wright). Les acides 2-4-diméthyl et 2-4-6-triméthyl-pyridine-3-5-dicarboxyliques sont inactifs pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain) de même que l' α - et la β -picoline (Landy).

Les composés pyraziniques sont dépourvus de toute activité pour *Shigella dysenteriae* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders) et *Streptobacterium plantarum* (Möller et Birkofer).

Les dérivés du thiazol ont une très faible activité pour le bacille dysentérique : 10000 fois moindre que celle de l'acide nicotinique (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders ; Schmelkes).

Les acides quinoléine- α - et β -carboxyliques sont dépourvus d'activité pour *Streptobacterium plantarum* (Möller et Birkofer).

La thionicotinamide aurait la même activité pour *Streptobacterium plantarum* que pour *Proteus vulgaris* ; nous avons déjà discuté cette question.

L'acide pyridine- β -sulfonique n'a montré aucune action pour *Staphylococcus aureus* (Knight et Mac Ilwain) et *Shigella dysenteriae* (Dorfman, Koser, Reames, Swingle, Saunders). Möller et Birkofer auraient constaté une légère activité sur la croissance de *Streptobac-*

terium plantarum mais leurs résultats sont irréguliers et difficiles à interpréter.

Dorfman, Koser, Reames, Swingle et Saunders ont montré que la saturation des doubles liaisons du noyau supprimait toute activité des composés pyridiniques β -substitués : l'acide nipécotique, l'arécoline ne peuvent remplacer l'amide nicotinique pour *Shigella dysenteriae*. Ils ont montré aussi que la vitamine B₆ était inactive.

RELATION ENTRE LA STRUCTURE ET L'ACTIVITÉ VITAMINIQUE DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE POUR LES MICROORGANISMES

La spécificité de la nicotinamide et de l'acide nicotinique en tant que facteur de croissance pour les bactéries est très étroite. Si, dans l'ensemble, les bactéries réagissent à peu près de la même façon aux dérivés de la pyridine, il existe toutefois entre les divers micro-organismes quelques différences. Celles-ci n'empêchent cependant pas de traduire d'une manière schématique ce qu'on peut appeler un comportement moyen qui est donné dans le tableau ci-contre. L'examen de ce tableau autorise quelques conclusions relatives aux rapports qui existent entre la structure des composés et leur activité physiologique en tant que facteur de croissance.

1. En règle générale, la nicotinamide, l'acide nicotinique et ses sels ont la même activité. Ils permettent un développement bactérien à la concentration de $M \times 10^{-8}$.

2. Seul l'ester méthylique est aussi actif à la même concentration ; l'ester éthylique est environ 10 fois moins actif, les esters propylique et butylique environ 100 fois moins.

3. Tous les dérivés de la pyridine β -substitués par un radical autre que — COOH sont inactifs. Seules la méthyl-3-pyridine et la pyridine-3-nitrile peuvent être utilisées par certaines bactéries qui doivent être capables de les transformer en acide nicotinique. Une concentration $M \times 10^{-4}$ de ces substances dans le milieu de culture est, en effet, nécessaire pour obtenir un développement visible ; c'est-à-dire qu'elles sont environ 10.000 fois moins actives que l'acide nicotinique.

4. Seuls les dérivés β -substitués sont actifs, les acides pyridine-2 et -4-carboxyliques sont pratiquement dépourvus d'activité.

5. Une substitution quelconque dans le noyau supprime toute activité sauf peut-être celle d'un groupement — COOH en position 2. Certains organismes, en effet, peuvent répondre à l'acide quinolinique ; sans doute sont-ils capables de le décarboxyler lentement.

6. La fixation sur l'N du noyau d'un groupement méthyle sup-

Tableau XXII

RAPPORT ENTRE LA STRUCTURE DES DÉRIVÉS DE L'ACIDE
PYRIDINE- β -CARBOXYLIQUE ET LEUR ACTIVITÉ VITAMINIQUE POUR LES BACTÉRIES

Acide nicotinique et ses sels de	Na, K, NH_4	++++
Substitution au radical —OH du groupement carboxyle en position 3, des radicaux.....	— NH_2	++++
	— CH_3	++++
	CH_3 — CH_2 —	+++
	CH_3 — CH_2 — CH_2 —; CH_3 — CH_2 — CH_2 — CH_2 —	++
	COOH — CH_2 — NH —	++
Substitution au groupement — COOH en position 3, des radicaux	— CH_3 ; — $^{\circ}\text{CN}$	o à $\pm$
	CH_3 — CO —; — NH_2 ; — SO_3H ..	o
	— COSH	++ (1)
Changement de position du groupe — COOH	En position 2.....	o
	En position 4.....	o à $\pm$
Substitution à un — H du noyau d'un des radicaux.....	— CH_3 (en position 6; 2 et 6; 2 et 4)	o
	CH_3 — CO —; — NH_2 (en posi- tion 2)	o
	— COOH (en position 2)	$\pm$
	— COOH (en position 4 ou 5).....	o
Composés d'addition de l'acide nicotinique, les groupements suivants étant fixés sur l'N du noyau pyridinique	CH_3Cl	o à ++
	CH_3I	o à $\pm$
Composés ayant un noyau hété- rocyclique azoté β — substitué par un radical — COOH	noyau saturé (acide nipécotique)...	o
	» pyrazinique	o
	» quinolinique	o
	» thiazolique	$\pm$

++++ : Substances ayant la même activité que l'acide nicotinique (c'est-à-dire actives à la concentration de $10^{-8} \times \text{M}$).

+++ : Substances 10 fois moins actives ($10^{-7} \times \text{M}$).

++ : Substances 100 fois moins actives ($10^{-6} \times \text{M}$).

+

± : Substances 1.000 fois moins actives ($10^{-5} \times \text{M}$).

o : Substances 10.000 fois moins actives ($10^{-4} \times \text{M}$).

o : Substances inactives.

prime ou diminue considérablement l'activité vitaminique ; les méthylchlorures sont plus actifs que les méthyliodures.

7. La saturation des doubles liaisons du noyau (acide nipécotique) la substitution de l'atome de C en position *para* par un atome d'N (dérivés de la pyrazine) ou l'addition d'un noyau benzénique au noyau pyridinique (noyau quinoléique) suppriment également toute activité.

Par contre, l'acide thiazol-5-carboxylique, isostère de l'acide nicotinique, semble bien être légèrement actif (10.000 fois moins que l'acide nicotinique). Ceci est intéressant du point de vue théorique ; en effet, il est difficile d'admettre que les bactéries puissent transformer cet acide thiazol-5-carboxylique en acide nicotinique et on peut se demander si celui-là ne prendrait pas vraiment la place de celui-ci dans la molécule des coenzymes I et II.

CHAPITRE IX

SPÉCIFICITÉ DE LA NICOTINAMIDE POUR L'HOMME ET LE CHIEN

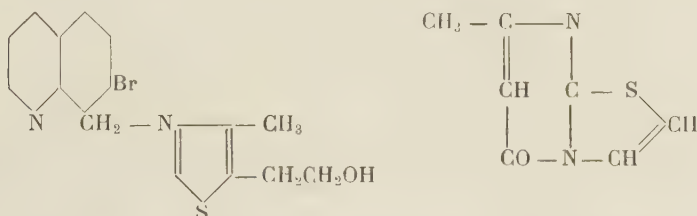
La vitamine P. P. ne semble jouer un rôle actif que combinée à l'état de nicotinamide sous la forme de coenzymes I et II. C'est donc la nicotinamide qui constitue la véritable vitamine P. P. Cependant, certains autres dérivés pyridiniques peuvent la remplacer et guérir la pellagre et la black-tongue.

Test croissance et test thérapeutique. — Lorsque l'on étudie l'action vitaminique d'une substance sur un microorganisme, on utilise principalement le test croissance. Les recherches sur la guérison des symptômes de l'avitaminose microbienne ne sont pas jusqu'ici intervenues dans l'appréciation du degré d'activité des divers composés. Ce test croissance est très sévère puisque l'on n'admet une action positive que lorsque des repiquages en série sont possibles, c'est-à-dire lorsqu'un certain nombre de divisions ou de générations se sont produites.

Pour ce qui concerne les vertébrés, deux techniques sont employées ; on peut : a) substituer un dérivé à la vitamine normale et voir s'il assure la croissance ; b) provoquer une avitaminose et déterminer si tel ou tel composé assure la guérison de la maladie. Ces deux tests devraient en principe donner les mêmes résultats. En fait, certains phénomènes secondaires peuvent fausser complètement les conclusions que l'on peut tirer du test thérapeutique, par conséquent, le test croissance seul devrait être utilisé.

Il est très difficile par l'emploi du test thérapeutique de décider si telle substance a réellement une activité vitaminique ou bien si elle en est totalement dépourvue et n'agit qu'en tant que médicament de « choc ». L'étude de cette question a été abordée dans le cas des carences en vitamine B₁. Funk (1922) considère que la guérison des symptômes du béribéri aigu peut avoir lieu théoriquement de deux façons : 1° par la vitamine spécifique ; 2° par des actions qui peuvent

mobiliser brusquement les réserves de vitamine qui se trouvent dans les organes et les tissus. Schultz (1942) remarque, en effet, que chez les animaux soumis à un régime carencé en vitamine B₁, la teneur des organes en cette vitamine diminue, mais que la vitamine ne disparaît jamais complètement, même dans les avitaminoses très graves. Il est donc possible que sous l'action d'une excitation physique ou chimique, les résidus vitaminiques tissulaires puissent être libérés mais il est clair qu'une telle mobilisation ne peut être répétée. D'après Schultz, pour pouvoir affirmer qu'une substance possède une action vitaminique spécifique, il faut : 1° qu'elle puisse produire des guérisons répétées chez un même animal ; 2° qu'elle puisse remplacer la vitamine après les premiers symptômes de carence au cours d'essais prolongés. Schultz a pu obtenir par exemple des pseudo-guérisons d'avitaminoses B₁ par des substances non spécifiques ayant la structure suivante :



Mais après rechute, ces composés se montrent totalement dépourvus d'activité.

On a constaté également que même dans les cas d'avitaminose P. P. les plus graves, il reste de la nicotinamide dans certains tissus. Ce sont en premier lieu et essentiellement le foie et le muscle qui s'appauvrissent en nicotinamide au cours de la carence. Il est donc possible que dans la pellagre comme dans le bérubéri, certaines substances puissent agir en mobilisant ou en déplaçant la vitamine P. P. résiduelle et soient dépourvues d'action spécifique, c'est-à-dire incapables de remplacer la nicotinamide dans la molécule des coenzymes I et II. Dans le tableau ci-contre, on a groupé côte à côte les résultats du test thérapeutique chez l'homme et chez le chien, et on a placé en regard l'activité des diverses substances pour *Proteus vulgaris*.

Conclusions. — Il faut remarquer que toutes les conclusions relatives à l'homme et au chien représentent les résultats d'essais thérapeutiques. Le test croissance, s'il ne peut être utilisé pour l'homme, pourrait cependant sans difficulté être appliqué au chien.

Nous voyons que, en plus de l'acide et de l'amide nicotinique, d'autres substances possèdent une action curative plus ou moins marquée vis-à-vis de la pellagre et de la black-tongue : ce sont les nicotines

d'ammonium et de sodium, l'ester éthylique de l'acide nicotinique. Le nicotinate de glycine ou acide nicotinurique peut guérir la black-tongue. L'activité antiblack-tongue n'est pas supprimée par substitution sur l'azote de la fonction amide d'un groupement méthyle (Wooley, Strong, Madden et Elvehjem), celle de deux groupements éthyle (coramine) respecte également l'activité antipellagreuse.

Les isomères de l'acide nicotinique : acide pyridine-2-carboxylique (picolinique) et -4-carboxylique (isonicotinique) sont incapables de guérir la black-tongue. L'acide nicotinique ayant subi dans le noyau une substitution d'un méthyle en position 6 ou d'un deuxième groupement carboxyle en position 2 (acide quinolinique) perd son activité antiblack-tongue (acide-6-méthyl-pyridine-3-carboxylique). Par contre, Vilter et Spies ont obtenu avec 5 pellagres ne présentant pas, il est vrai, des symptômes très aigus, des réponses « dramatiques » après administration de 1 gr. d'acide quinolinique par voie buccale. Vilter, Bean et Spies n'obtiennent qu'une amélioration temporaire en traitant des malades présentant des symptômes légers, soit par l'acide dinicotinique (acide pyridine-3-5-dicarboxylique), soit par l'acide 2-6-diméthyl-3-5-dicarboxylique.

La pyridine, les pyridines-3-nitrile, 3-acétyle et 3-amino sont dépourvues d'activité antiblack-tongue, tandis que la méthyl-3-pyridine (β -picoline) est légèrement active, mais beaucoup moins que l'acide nicotinique (Wooley, Strong, Madden et Elvehjem). Ces mêmes auteurs ont essayé sans succès l'éthylnicotino-acétate et l'acide pyridine-3-sulfonique.

La fixation de certains groupements sur l'azote du noyau pyridinique conserve les propriétés vitaminiques : le chlorhydrate et le glucosido-iodure de nicotinamide sont actifs pour le chien. Au contraire la fixation d'un groupement méthyle la supprime : les méthylchlorures de l'acide et de l'amide nicotinique sont inactifs. La trigonelline n'a aucune action vitaminique ni chez l'homme ni chez le chien, non plus que l'acide nipécotique.

L'activité des dérivés de la pyrazine a été étudiée chez l'homme et chez le chien. Bills, Mac Donald et Spies (1939), avec les acides pyrazine-2-carboxylique et -2-3-dicarboxylique ont obtenu dans la pellagre humaine des guérisons « dramatiques ». D'après Elvehjem (1940), l'action de ces composés sur le chien est très particulière : des résultats positifs ne peuvent être obtenus que sur des animaux montrant des symptômes légers de black-tongue ; encore les chiens ne réagissent-ils qu'aux deux premières injections seulement, jamais à la troisième. Il est donc possible que l'action des dérivés pyraziniques ne soit pas spécifique, et qu'ils agissent seulement en mobilisant les dernières réserves de vitamine P. P. Cependant, Bills, Mac Donald et Spies ont observé des guérisons répétées chez l'homme. Les sujets étudiés ne présentaient pas, il est vrai, des symptômes aigus ; par

Tableau XXIII

ACTIVITÉ VITAMINIQUE COMPARÉE DES DÉRIVÉS DE LA PYRIDINE POUR L'HOMME,
LE CHIEN ET « *PROTEUS VULGARIS* »

	Homme	Chien	<i>Proteus vulgaris</i> (4)
Acide nicotinique	+ (S)	+	$+ 1 \times 10^{-8}$ (F.)
Amide de l'acide nicotinique.....	+ (SBS)	+	$+ 1 \times 10^{-8}$ (F.)
Nicotinate de sodium	+ (SBS)		+ (P)
» d'ammonium	+		+ (P)
» d'éthyle		+	$+ 0,5 \times 10^{-6}$
» de glycine (ac. nicotinurique)		+	$+ 1 \times 10^{-6}$
Méthylamide de l'acide nicotinique.		+	
Diéthylamide de l'acide nicotinique (coramine)	+ (SBS)	+	$+ 1 \times 10^{-5}$
Acide pyridine-2-carboxylique (picolinique)		o	$0,2 \times 10^{-3}$
» pyridine-4-carboxylique (isonicotinique)		o	$+ 1 \times 10^{-4}$
6-méthylamide de l'acide nicotinique		o	$0,6 \times 10^{-4}$
Acide pyridine-2-3-dicarboxylique (quinolinique)	+ (V)	o (M)	$+ 1 \times 10^{-4}$
» pyridine-3-5-dicarboxylique (dinicotinique)	$\pm$ (V) (1)		o (P)
» pyridine-2-6-diméthyl-3-5-dicarboxylique	$\pm$ (V) (1)		
Pyridine	o	o	$0,1 \times 10^{-3}$
3-méthylpyridine (3-picoline)		+ (2)	$+ 1 \times 10^{-4}$
Pyridine-3-nitrile		o	$+ 1,4 \times 10^{-4}$
3-aminopyridine		o	
3-acétylpyridine		o	
Acide pyridine-3-sulfonique		o	$+ 1,3 \times 10^{-2}$ (MB)
Éthylnicotinoacétate			
Nicotine	o	o	$+ 1,2 \times 10^{-4}$ (MB) (3)
Chlorhydrate de nicotinamide		+	
Méthylchlorure de nicotinamide ..		o	$+ 1 \times 10^{-6}$
» de l'acide nicotinique		o	$+ 1 \times 10^{-6}$
Glucosidoiodure de l'acide nicotinique		+	
Trigonelline	o (SBS)	o	o
Acide pyrazine-2-3-dicarboxylique..	+ (B) (3)	$\pm$ (E)	$0,16 \times 10^{-2}$ (MB)
» pyrazine-3-monocarboxylique.	+ (B) (3)		$0,1 \times 10^{-3}$ (T)
» thiazol-5-carboxylique		$\pm$ (E)	$0,1 \times 10^{-2}$ (MB)
» nipécotique		o	$+ 1,2 \times 10^{-3}$ (MB)

Les données relatives à l'homme et au chien sont les résultats de tests thérapeutiques : guérison de la pellagre et de la black-tongue. Pour *Proteus vulgaris*, le test croissance a seul été utilisé.

Homme : (S) = Spies, Cooper et Blankenhorn; (SBS) = Spies, Bean et Stone; (V) = Vilter et Spies; (B) = Bills, Mac Donald et Spies.

Chien : Sans indication : Wooley, Strong, Madden et Elvehjem; (E) = Elvehjem (1940); (M) = Mac Kibbin et Elvehjem. In Elvehjem (1940).

Proteus : (F.) Fildes; (MB) = Möller et Birkofer; (P) = Pelczar et Porter; (T) = M^{me} Tréfouël et M. Morel. Sans indication : Lwoff et Querido.

(1) L'action favorable est temporaire. Ces substances ne peuvent pas remplacer la nicotinamide.

(2) Substances moins actives que l'acide nicotinique.

(3) Activité beaucoup plus faible que celle de l'acide nicotinique. Résultats positifs obtenus seulement chez des chiens montrant des symptômes légers et aux deux premières injections seulement.

(4) Les chiffres représentent des concentrations moléculaires.

ailleurs, il est bien rare que le régime de l'homme soit entièrement privé de vitamine P. P. La question de l'activité des dérivés pyraziniques n'est donc pas encore réglée à l'heure actuelle de façon définitive. Il est intéressant de noter que Elvehjem (1940) a constaté une très faible action de l'acide thiazol-5-carboxylique sur la black-tongue du chien.

Il est donc très difficile de tirer de ces données des conclusions relatives à l'activité pour les vertébrés des dérivés de l'acide pyridine- β -carboxylique. Elles ne pourront être déduites que du test croissance.

On peut être cependant certain que quelques dérivés de l'acide pyridine- β -carboxylique sont actifs en tant que vitamine P. P. Ce sont l'acide nicotinique, l'amide de l'acide nicotinique et sans doute le nicotinate d'éthyle. Pour ce qui concerne les autres substances, on ne peut dire encore si elles sont réellement transformées en nicotinamide dans l'organisme ou si elles n'agissent qu'en tant que médicament de choc paraspécifique. Si l'on admet que la vitamine P. P. est représentée essentiellement par l'acide et par l'amide nicotinique, on peut conclure provisoirement que le *Proteus* réagit d'une façon assez spécifique aux produits doués d'activité vitaminique P. P.

Ceci ressort très clairement de l'examen du tableau donné dans ce chapitre.

CHAPITRE X

LES TESTS SHIGELLA ET LACTOBACILLUS APPLIQUÉS AU DOSAGE DE LA VITAMINE P. P.

Nous avons vu que l'acide nicotinique et son amide représentaient des facteurs de croissance pour quelques microorganismes autres que *Proteus vulgaris*. Cette propriété a été mise à profit pour le dosage de la vitamine P. P. dans les milieux biologiques : le bacille de Shiga a été utilisé par Dorfman, Koser, Horwitt, Berkman et Saunders pour le dosage de la nicotinamide du sang, *Shigella paradysenteriae* a été employé par Isbell, Wooley, Butler et Sebrell, et enfin récemment Snell et Wright ont préconisé l'usage d'une bactérie lactique : *Lactobacillus arabinosus*. Nous allons étudier rapidement les techniques proposées par ces auteurs.

Shigella dysenteriae. — Dorfman, Koser, Horwitt, Berkman et Saunders ont proposé une méthode de dosage de la nicotinamide et de certains dérivés pyridiniques voisins dans le sang à l'aide du bacille de Shiga. Ces auteurs ne déterminent pas la croissance bactérienne mais la quantité d'acide produit par une culture de bacilles dysentériques développée en milieu glucosé en présence d'une quantité définie du liquide étudié ou d'une solution-étalon de nicotinamide.

Le milieu utilisé est un milieu synthétique contenant 0,5 o/o de glucose, du phosphate dipotassique, du sulfate de magnésium et un mélange de 15 acides aminés. Les cultures sont effectuées en tubes à essais contenant un volume total de liquide de 5 cm³. L'ensemencement est pratiqué avec 0,1 cm³ d'une suspension très faible de bactéries faite dans une solution-tampon au moment même de l'emploi à partir d'une culture de 24 heures sur gélose. Le temps d'incubation est de 4 jours à 37°. La quantité d'acide formé est titrée avec de la soude 0,01 N en présence de bleu de bromo-thymol. La quantité de nicotinamide correspondante est évaluée par comparaison avec une courbe d'étalonnage obtenue en portant sur un graphique les titres en acide

correspondant à une série de cultures effectuées en présence de quantités connues de nicotinamide. Cette courbe doit être tracée pour chaque expérience, car la réponse du bacille à une quantité définie d'amide nicotinique peut varier d'un dosage à l'autre.

La spécificité de la nicotinamide pour la croissance des bacilles dysentériques a été étudiée en détail dans un chapitre précédent. Il est important de rappeler que cette bactérie ne réagit pas de la même façon à l'acide nicotinique et à son amide. D'après Dorfman, Koser, Reames, Swingle et Saunders, la différence entre les actions de l'acide et de l'amide nicotinique porte uniquement sur la vitesse d'utilisation de ces deux substances par les bactéries. L'augmentation de l'acidité du milieu est beaucoup plus lente si la culture est effectuée en présence d'acide nicotinique, mais si le temps d'incubation est suffisant, le titre final est sensiblement le même. Dans les conditions où se placent les auteurs, on peut admettre que le bacille dysentérique dose également l'acide et l'amide nicotinique. Par contre, les cultures effectuées en présence de coenzymes I et II présentent une lag-phase analogue à celle observée en présence d'acide nicotinique, mais ici le titre final n'est pas le même.

Il semble que l'on puisse faire plusieurs critiques à cette méthode :

- 1° le milieu de culture utilisé est très complexe ;
- 2° le temps d'incubation est de 4 jours ;
- 3° pour chaque expérience nouvelle, il faut tracer la courbe d'étalonnage correspondante.

Shigella paradysenteriae. — Fraser, Topping et Sebrell (1938) ont donné le principe d'un dosage de la nicotinamide basé sur le développement de *Shigella paradysenteriae* (Sonne). Isbell, Wooley, Butler et Sebrell tout récemment ont repris cette technique et l'ont appliquée au sang et au liquide céphalo-rachidien.

Le milieu de base utilisé est celui de Lwoff et Querido additionné de chlorhydrate de thiamine (0,02 0/00) dans lequel la souche employée se développe aussi bien qu'en présence du mélange d'acides aminés de Fraser, Topping et Sebrell. Les cultures sont effectuées dans des tubes à essais (20 mm. de diamètre) dans lesquels on introduit d'abord une quantité connue de nicotinamide ou de solution à doser, puis 5 cm³ de milieu ; on amène le volume total à 10 cm³ par de l'eau, les tubes sont bouchés puis stérilisés à l'autoclave. Après refroidissement, l'ensemencement est pratiqué avec une goutte d'une suspension de *Shigella paradysenteriae*. Le temps d'incubation est de 22 heures à 31°. Les mesures de densité optique sont effectuées à l'aide d'un photomètre à cellule photoélectrique.

Il faut obtenir des cultures en présence de différentes quantités connues de nicotinamide ; avec les chiffres obtenus ainsi, on construit une courbe d'étalonnage qui permet de déterminer par interpolation

les « équivalents de nicotinamide » présents dans le liquide étudié. Il faut tracer cette courbe pour chaque série de dosage car la réponse observée peut varier d'un jour à l'autre. La réponse de *Shigella dysenteriae* aux différents dérivés pyridiniques est d'après Dorfman, Koser, Reames, Swingle et Saunders, la même que celle du bacille dysentérique.

Cette méthode de dosage comporte plusieurs causes d'erreurs. La principale est que la réponse de la bactérie utilisée à des concentrations croissantes d'acide nicotinique est plus lente et moins régulière que celles obtenues avec l'amide nicotinique, le seuil de la réaction étant plus élevé. Il est probable que pendant l'extraction de la vitamine P. P. des tissus étudiés, une partie de l'amide est transformée en acide libre, par conséquent le chiffre d'« équivalent de nicotinamide » obtenu est certainement inférieur au chiffre réel. Le temps d'incubation : 22 heures à 31° n'est sans doute pas suffisant. D'après les résultats de Dorfman, Koser, Reames, Swingle et Saunders, en effet, en augmentant le temps d'incubation jusqu'à 4 jours, la différence entre les réponses de *Shigella paradysenteriae* à l'acide et à l'amide nicotinique diminue beaucoup. Cette méthode présente un autre inconvénient grave : il est nécessaire, pour *Shigella paradysenteriae* comme pour *Shigella dysenteriae*, de tracer une nouvelle courbe d'étalonnage pour chaque série de dosages, ce qui augmente beaucoup le nombre des manipulations.

Lactobacillus arabinosus. — Snell et Wright dosent la vitamine P. P. à l'aide de *Lactobacillus arabinosus*. Ces auteurs n'utilisent pas comme mesure de la réponse à l'acide nicotinique la croissance bactérienne, mais ils dosent, par de la soude, la quantité d'acide lactique formé dans le milieu de culture en présence de glucose.

Le milieu de culture utilisé est extrêmement complexe et contient, en dehors du glucose et des sels minéraux habituels : du tryptophane, de la cystine, un mélange de bases puriques (adénine, guanine et uracile) et diverses vitamines : thiamine, pantothénate de calcium, vitamine B₆, riboflavine, biotine et enfin un hydrolysate acide de caséine.

L'étalonnage ici aussi doit être fait pour chaque nouvelle série de dosages. En outre, il faut avoir soin d'effectuer des cultures en présence de plusieurs dilutions pour chaque solution étudiée et prendre la moyenne des valeurs obtenues ceci pour éviter de grosses erreurs.

Pour *Lactobacillus arabinosus*, Snell et Wright montrent que la nicotinamide, l'acide nicotinique, la cozymase et l'acide nicotinurique ont la même activité. La trigonelline est inactive.

Les critiques que l'on doit faire à cette méthode de dosage sont analogues à celles faites pour les tests *Shigella*.

1° Le milieu de culture est très complexe et comprend en particulier

une préparation concentrée de biotine qui peut varier d'un échantillon à l'autre.

2° La courbe d'étalonnage doit être tracée à chaque expérience. Pour que le taux de nicotinamide obtenu soit valable, il faut prendre la moyenne des chiffres obtenus avec diverses dilutions du liquide étudié.

Notons que l'acide nicotinurique est aussi actif, pour *Lactobacillus arabinosus*, que l'acide nicotinique alors que pour *Proteus vulgaris*, il est 165 fois moins actif. Les résultats obtenus par ces deux méthodes, spécialement avec l'urine, seront donc différents.

Nous voyons que les inconvénients de ces différentes méthodes sont tous analogues.

Le test *Proteus* présente sur les autres tests bactériens proposés pour les dosages de la vitamine P. P. les avantages suivants :

- 1° le milieu de culture utilisé est très simple ;
 - 2° les réponses quantitatives de *Proteus vulgaris* à la nicotinamide et à l'acide nicotinique sont les mêmes ;
 - 3° la courbe d'étalonnage reste toujours valable. Ajoutons que cette courbe est une droite, ce qui permet des déterminations beaucoup plus précises et supprime les erreurs dues aux interpolations.
-

CHAPITRE XI

SPÉCIFICITÉ COMPARÉE DES MÉTHODES DE DOSAGE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

Principe des méthodes chimiques de dosage de l'acide nicotinique.

— Le principe des deux méthodes actuellement en usage est le même : il utilise la propriété de certains composés d'addition de la pyridine, qui en présence d'amines primaires ou secondaires conduisent à des matières colorantes que l'on peut doser photométriquement.

La méthode de Vongerichten qui a été décrite en 1899 presque simultanément par cet auteur, par L. Spiegel et par B. Gail, utilise le produit de condensation de la pyridine et du 2-4-dinitrochlorobenzène. Cette méthode a été utilisée par Karrer et Keller (1938), par Vilter, Spies et Mathews (1938).

König (1904) a montré que le produit d'addition du bromure de cyanogène et de la pyridine pouvait se combiner avec des amines aromatiques pour donner également des matières colorantes dont la teinte varie du jaune au violet suivant l'amine employée. La plupart des auteurs ont préféré cette méthode qui est beaucoup plus sensible que celle de Vongerichten ; de nombreuses amines peuvent être utilisées. Swaminathan, Melnick et Field, Kringstad et Naess, Pearson, Ritsert ont employé l'aniline ; Bandier et Hald, Bandier, le métol (sulfate de *p*-méthylaminophénol), Euler, Schlenk, Heiwinckel et Högberg, la naphtylamine. Harris et Raymond, après avoir essayé différentes amines aromatiques ont choisi la *p*-aminoacétophénone : la coloration est 3 à 5 fois plus intense que celle obtenue avec les autres amines, et elle est stable à l'obscurité. Kodicek utilise aussi cette amine qui permet de doser de 1 à 2 γ d'acide nicotinique dans 1 gr. de substance. Raoul et Crépy (1941) préfèrent utiliser la *p*-aminophénylsulfamide qui donne une coloration moins stable, mais aussi intense.

Spécificité des méthodes chimiques. — Il n'y a aucune différence de spécificité entre la méthode au 2-4-dinitrochlorobenzène et celle au bromure de cyanogène qui reposent sur les mêmes réactions.

Euler, Schlenk, Heiwinckel et Högberg, puis Kodicek ont essayé sans résultat un grand nombre d'acides aminés ou d'amines dérivées de protides. La réaction utilisée exige en fait la présence du noyau pyridinique avec certaines conditions supplémentaires.

Une première remarque importante s'impose : l'amide nicotinique donne une coloration d'intensité environ trois fois moindre que celle fournie par l'acide nicotinique. Ce fait entraîne la nécessité d'une conversion préalable de l'amide en acide pour le dosage.

Certains dérivés immédiats de l'acide nicotinique tels que la diéthylamide (coramine) fournissent, d'après Kodicek, des réactions aussi fortes que celle de l'acide nicotinique. La β -picoline (3-méthylpyridine) et la nicotine donnent aussi une coloration. La présence d'une chaîne latérale en position β semble donc avoir une certaine importance dans les réactions. Cependant avec la pyridine et l'acide nippécotique, Kodicek obtient également une coloration.

D'après Raoul et Crépy, l'azote doit rester trivalent : ces auteurs ont constaté en effet que le méthyl iodure de pyridine et la trigonelline ne donnaient aucune coloration. Ceci peut s'expliquer par le fait que les composés pyridiniques à azote pentavalent ne peuvent fixer le bromure de cyanogène dans le premier stade de la réaction.

D'après différents auteurs (Kodicek ; Raoul et Crépy) le carbone en α ne doit pas être substitué pour permettre l'ouverture du noyau pyridinique. C'est ainsi que Raoul et Crépy ont montré que l' α - α' -lutidine (2-6-diméthylpyridine) ne donnait aucune réaction. L' α -aminopyridine, la vitamine B₆, l'acide quinolinique (Kodicek, Raoul et Crépy) sont également inactifs. Par contre, Raoul et Crépy ont observé une très faible coloration avec l' α -picoline (2-méthylpyridine).

Comparaison avec la spécificité du test Proteus vulgaris. — Le tableau ci-contre donne les résultats obtenus avec certains dérivés de la pyridine, soit par les méthodes chimiques, soit avec le test *Proteus vulgaris*. On voit que les méthodes chimiques dosent la pyridine, la nicotine, et d'une façon générale les dérivés pyridiniques à azote trivalent substitués en position β . La nicotine donnant une réaction colorée avec la méthode de König, la présence de cette substance dans l'urine peut constituer une cause d'erreur non négligeable chez les fumeurs. Le *Proteus*, nous l'avons vu, se comporte dans l'ensemble comme l'homme et le chien et en particulier ne dose ni la pyridine, ni la nicotine, et réagit quantitativement de façon identique à l'acide et à l'amide nicotinique.

La méthode chimique appliquée au dosage des corps doués d'activité vitaminique P. P. donne en principe des résultats de valeur inférieure à ceux du test *Proteus*. En fait, il se trouve que dans l'organisme animal le seul dérivé de la pyridine substitué en position 3 se trouve être la nicotinamide que l'hydrolyse préalable transforme en

acide nicotinique et les méthodes chimiques donnent effectivement les mêmes valeurs que le test *Proteus* pour les divers tissus et organes.

Tableau XXIV

SPÉCIFICITÉ COMPARÉE DES TESTS CHIMIQUES ET DU TEST « PRÔTEUS »

	Tests chimiques	Test Proteus
Acide nicotinique	+	++++
Nicotinamide	±	++++
Diéthylamide de l'acide nicotinique (coramine).....	+	+
3-méthylpyridine (β-picoline)	+	±
Nicotine	+	o
Acide nipécolique	±	o
Pyridine	+	o
Méthylodure de pyridine	o	o
Trigonelline	o	o
2-6-diméthylpyridine (α-α'-lutidine)	o	o
2-méthylpyridine (α-picoline)	±	o
2-aminopyridine	o	o
Acide pyridine-2-3-dicarboxylique (quinolinique) ...	o	±
Vitamine B ₆	o	o

Pour ce qui concerne les tissus végétaux, la question est plus délicate. Beaucoup de végétaux sont riches en trigonelline et il est possible que certains produits du métabolisme intermédiaire de cette substance puissent réagir avec les tests chimiques ; la question a même été posée par Kodicek de la présence de « chromogènes » dépourvus d'activité vitaminique et qui seraient mis en évidence par la réaction de König. L'emploi du test *Proteus* a permis de montrer que l'hydrolyse alcaline ne libérait pas de chromogènes mais permettait simplement une extraction plus complète de l'acide nicotinique. Dans l'ensemble, lorsqu'ils sont appliqués au matériel biologique, le test *Proteus* et les méthodes chimiques donnent des résultats identiques.

CHAPITRE XII

APPLICATION DU TEST *PROTEUS VULGARIS* AU DOSAGE DE LA VITAMINE P. P. DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Nous avons montré que le test *Proteus* permettait dans les conditions précises qui ont été établies de doser la nicotinamide en solution dans l'eau ou dans un milieu synthétique simple. Pour que cette méthode puisse recevoir des applications pratiques, il faut être certain que l'addition au milieu de culture de la substance biologique étudiée ne modifie pas le rendement de la croissance de *Proteus vulgaris* en fonction de la nicotinamide, et par conséquent que la courbe d'étalonnage établie est valable.

Nous avons vu que le sérum, frais ou ayant subi une hydrolyse acide, diverses vitamines et un mélange de douze acides aminés n'ont, aux concentrations en jeu dans les conditions du dosage, aucune action sur le développement de la souche N. Malgré ces résultats négatifs, il est nécessaire, chaque fois que cette méthode est appliquée à un nouveau milieu biologique, de vérifier :

a) qu'on retrouve bien la nicotinamide ajoutée, c'est-à-dire que la courbe d'étalonnage obtenue, avec des quantités variables de vitamine P. P. en présence d'une quantité donnée de la substance étudiée est parallèle à la courbe standard ;

b) que pour la liqueur étudiée, la densité optique des cultures est proportionnelle aux concentrations employées.

Nous examinerons en détail les techniques particulières relatives aux différents produits. Certains, comme le sang et l'urine, peuvent être ajoutés tels quels au milieu de culture, les autres doivent subir une extraction. Les meilleurs résultats sont en général obtenus avec une hydrolyse effectuée en présence de 8 o o d'HCl, à chaud. L'extrait qui doit être limpide et de préférence incolore est stérilisé à l'autoclave après dilution convenable. 1 cm³ de cet extrait est ajouté stérilement à 9 cm³ de milieu (dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 cm³). La fiole,

ensemencée avec 11 gouttes de souche carencée de 24 heures, est capuchonnée et mise à l'étuve à 28° pour 36 heures. On effectue en général des cultures en présence de deux dilutions différentes de chaque extrait, chaque culture étant toujours faite en double. Suivant la technique classique, on constitue trois témoins :

- a) milieuensemencé ;
- b) milieu nonensemencé ;
- c) milieu + 1 cm³ d'extrait nonensemencé.

Soit D la densité optique totale dans le milieu additionné de l'extrait à doser etensemencé ; la densité optique du développement bactérien correspondant à la nicotinamide de l'extrait sera :

$$d = D - (a + c - b).$$

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE P. P. DANS LE SANG

Querido, Lwoff et Lataste ont utilisé le test *Proteus vulgaris* pour le dosage de la nicotinamide dans le sang. Leur technique ne comporte pas d'extraction de la nicotinamide : par ponction veineuse, on prélève du sang (5 cm³) qui est défibriné très soigneusement ; 1 cm³ de sang défibriné est introduit dans 9 cm³ d'eau bidistillée. Après hémolyse, il est centrifugé pour éliminer les stromas et filtré sur bougie Chamberland L₃. Ce sang hémolysé stérile est convenablement dilué (1 pour 70 à 1 pour 100) et introduit dans le milieu de culture suivant la technique habituelle. Pour que cette méthode soit valable, il faut que les chiffres obtenus au cours de différents dosages d'un même échantillon de sang soient constants et que l'on puisse retrouver la nicotinamide ajoutée au sang.

1° Querido, Lwoff et Lataste ont trouvé, pour des dosages effectués sur le même échantillon de sang : a) le jour de la prise ; b) après 8 à 14 jours, des chiffres concordants, l'erreur maxima observée étant de 5 o/o.

2° Pour la nicotinamide ajoutée au sang, ces auteurs ont trouvé d'abord des chiffres de 10 à 35 o/o trop élevés. Il aurait pu s'agir d'une augmentation du rendement de la croissance du *Proteus vulgaris* en fonction de la nicotinamide due aux protéines du sang. Cependant, le plasma citraté était sans action.

Ces auteurs ayant établi la courbe donnant la croissance de *Proteus vulgaris* en fonction de diverses quantités de sang, ont constaté que celle-ci n'est proportionnelle au sang que dans certaines conditions seulement, pour des cultures ayant une densité optique propre comprise entre 60 et 80 divisions de notre appareil de Meunier. Pour des dilutions inférieures, la courbe d'étalonnage du sang est en dessous

de celle qui correspond à des solutions de nicotinamide. La croissance devient nulle pour une concentration en sang correspondant à une teneur en nicotinamide de 0,16 γ pour 100 cm^3 de milieu. En présence d'une même quantité de nicotinamide la courbe d'étalonnage, correspondant à des dilutions variables de sang, est parallèle à la courbe standard et passe par le zéro. On retrouve ainsi la nicotinamide ajoutée, et la nicotinamide totale du sang. L'augmentation de 10 à 35 0 0 observée précédemment n'était qu'apparente et tenait à ce que la courbe de dosage de la nicotinamide du sang ne passe pas par le zéro. Si l'on calcule la concentration du sang en nicotinamide d'après la courbe réelle, on retrouve, dans les limites de l'erreur de la méthode, la nicotinamide ajoutée.

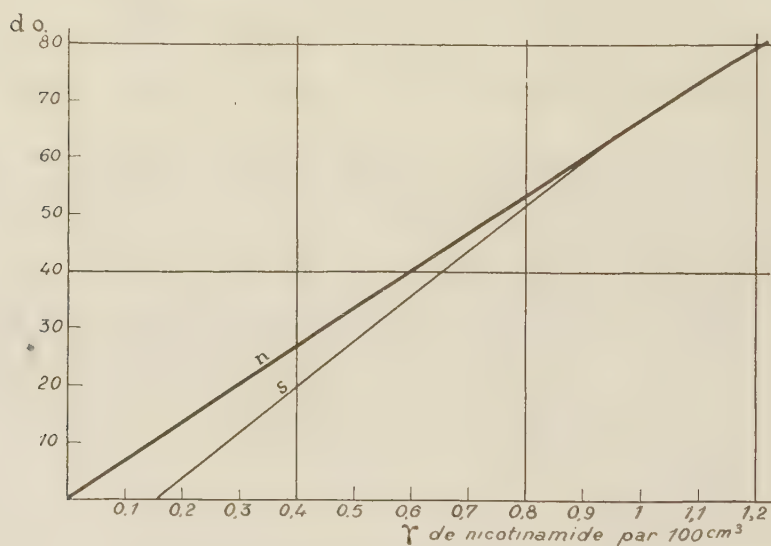


FIG. 9. — Courbes d'étalonnage de *Proteus vulgaris* (d'après Querido, Lwoff et Lataste).

n : en fonction de la concentration en nicotinamide dans le milieu synthétique simple ;
s : en présence de sang.

Pratiquement, pour doser la nicotinamide du sang, il y a avantage à utiliser des concentrations donnant des cultures de densité optique comprise entre 62 et 80 ; au delà de 80 la courbe s'infléchit et devient difficilement utilisable. Si la densité optique des cultures est inférieure, il faut reporter le point trouvé sur la courbe du sang et lire la concentration en nicotinamide correspondante. Il est préférable de défibriner le sang. En effet, Querido, Lwoff et Lataste ont parfois observé en présence de sang total non défibriné, citraté ou non, un louche dans le milieu. Ces auteurs ont vérifié que la défibrination n'entraînait pas de perte de nicotinamide. La filtration sur bougie

Chamberland est également sans influence appréciable sur la teneur en nicotinamide.

Dorfman, Koser, Horwitt, Berkman et Saunders (1940) ont effectué des recherches sur la nicotinamide du sang à l'aide du test *Shigella dysenteriae*, suivant la technique que nous avons décrite dans un chapitre précédent. Ces auteurs ont ainsi obtenu des valeurs de nicotinamidémie variant entre 0,49 et 0,68, la moyenne de 6 déterminations étant de 0,58. Sur les mêmes échantillons de sang autoclavés, la valeur a oscillé entre 0,75 et 0,94; moyenne 0,83; différence moyenne 0,25 ce qui correspond à une augmentation de 43 o/o.

D'après les recherches de Lwoff et Querido (1941) le dosage par le test *Proteus* sur le sang déprotéiné par le sulfate d'ammonium en milieu acide donne exactement les mêmes résultats que les dosages effectués sur le sang total. Mais si l'on chauffe le filtrat 2 heures à 130° on trouve régulièrement des valeurs plus élevées (voir tableau ci-contre); la valeur trouvée en plus est en moyenne de 0,22 mgr. pour 100 cm³; elle semble à peu près constante, quelle que soit la valeur de la nicotinamidémie. Lwoff et Querido ayant constaté que le test *Proteus* donnait les mêmes résultats sur le coenzyme II filtré sur bougie Chamberland et sur ce filtrat chauffé à l'autoclave, ont conclu à l'existence possible dans le sang d'un dérivé de la pyridine qui serait transformé par le chauffage en une substance utilisable par le *Proteus vulgaris*.

Nous avons montré depuis que la croissance de *Proteus vulgaris* en présence de coenzyme I était environ moitié de celle observée en présence d'une quantité équimoléculaire de nicotinamide; un phénomène analogue intervient sans doute aussi pour le coenzyme II. On pouvait donc envisager l'hypothèse que la « pyridine X » de Lwoff et Querido ne serait autre que les coenzymes I et II. Pour essayer de le démontrer nous avons alors effectué des dosages :

- a) sur le sang total stérilisé par filtration (sang humain);
- b) sur le sang total autoclavé 1 heure à 130° avec 5 o/o HCl, puis filtré sur filtre sans cendre, neutralisé et stérilisé 20 minutes à 120°;
- c) sur le sang déprotéiné suivant la technique de Lwoff et Querido (1941) : le sang défibriné est centrifugé; le sérum est pipeté et remplacé par un volume égal d'eau distillée; à 5 cm³ de sang au 1/10, on ajoute 2 cm³ d'HCl *n*/10; après 5 minutes, on ajoute 2 cm³ de sulfate d'ammonium à saturation et 1 cm³ d'eau distillée; après 20 minutes, on centrifuge, on neutralise le liquide surnageant qui est ensuite filtré sur bougie et utilisé pour le dosage;
- d) sur le même filtrat autoclavé 1 heure à 120° en présence de 5 o/o HCl, puis neutralisé et stérilisé.

Nous avons ainsi obtenu les résultats suivants :

1° si, pour chaque fraction on établit une courbe donnant la densité optique des cultures en fonction de la concentration du liquide

étudié, la courbe correspondant au filtrat déprotéiné passe par le zéro, celle correspondant au sang total, comme l'ont montré Lwoff, Querido et Lataste, n'y passe pas ;

2° par chauffage, on observe toujours une augmentation d'activité sur la croissance de *Proteus vulgaris*, aussi bien sur le filtrat déprotéiné par le sulfate d'ammonium que sur le sang total. Cette augmentation, dans nos expériences, varie de 25 à 50 o/o alors que pour des solutions de cozymase pure, elle est de presque 100 o/o.

Tableau XXV

INFLUENCE DE L'HYDROLYSE SUR LE DOSAGE DES DÉRIVÉS PYRIDINIQUES DU SANG

	Mg de vitamine P. P. pour 100 g. de sang	Augmentation par hydrolyse
A. Sang filtré	0,66	
» déprotéiné filtré	0,60	
» » autoclavé (1)	0,79	25 o/o
I. Sang total filtré	0,65	
» » autoclavé (1)	0,95	46 o/o
» déprotéiné filtré	0,79	
» » autoclavé (1)	1,05	32 o/o

(1) En présence de 5 o/o de HCl, 1 heure à 130°.

Kohn et Bernheim ont effectué à l'aide du test *Hemophilus para-influenzae* une série de dosages de coenzymes dans les hématies. D'après les calculs de A. Lwoff (*in* Justin-Besançon et Lwoff) les chiffres donnés correspondent, pour la femme à 6 à 8 mgr. de facteur V pour 100 cm³ d'hématies, soit 0,49 à 0,69 mgr. de nicotinamide pour 100 cm³ de sang ; pour l'homme à 5 à 7 mgr. de facteur V correspondant à une nicotinamidémie de 0,41 à 0,57. Cependant les valeurs trouvées par Kohn et Bernheim peuvent aller jusqu'à 0,82 et 0,90. Lwoff, Querido et Lataste (1939) considèrent que la nicotinamidémie normale varie entre 0,70 et 0,85, la moyenne étant de 0,80 ; d'après ce que nous venons de voir, il faudrait augmenter ce chiffre de 35 o/o en moyenne. La nicotinamidémie moyenne normale serait donc voisine de 1,1. Y. Raoul a effectué par voie chimique de nombreux dosages de vitamine P. P. dans le sang. La méthode de déprotéinisation qu'il a utilisée évite, semble-t-il, toute adsorption de l'acide nicotinique sur les protéines. Les résultats de Raoul ont été publiés dans le travail de Horiot (1942) : la nicotinamidémie normale moyenne

oscille entre 0,5 et 0,9 mgr. pour 100 cm³, la moyenne de 50 déterminations étant de 0,7.

La moyenne normale 0,65 calculée d'après les chiffres de Kohn et Bernheim correspond donc à une valeur inférieure à celle donnée par Querido, Lwoff et Lataste et par Raoul. Si l'on tient ces chiffres pour exacts, 65 o/o seulement de la vitamine P. P. du sang seraient sous forme de coenzymes I ou II. L'augmentation d'activité due à l'hydrolyse devrait donc être de 65 o/o au lieu de 100 o/o. La moyenne des augmentations obtenues par Lwoff et Querido et par nous : 36 o/o est encore très inférieure à cette valeur. On peut alors envisager deux hypothèses :

a) il existerait dans le sang une substance favorisant l'utilisation des coenzymes I et II par *Proteus vulgaris*, ou une substance empêchant leur hydrolyse complète par chauffage de 1 heure à 130° en milieu acide ;

b) le mélange de coenzymes I et II, présents dans le sang, serait plus favorable à la croissance bactérienne que chacun des coenzymes isolés, sans cependant permettre un développement égal à celui correspondant à la nicotinamide de ces coenzymes.

On peut conclure de l'ensemble de ces données que deux ordres de phénomènes interviennent pour troubler le développement du *Proteus* dans le sang total :

1° il existe incontestablement dans le sang une ou plusieurs substances inhibitrices ; ceci résulte nettement des constatations de Lwoff, Querido et Lataste, relatives à l'absence totale de développement en présence de très faibles concentrations de sang et au rétablissement d'une croissance normale par addition d'une petite quantité de nicotinamide ; on pouvait cependant se demander si cette « inhibition » ne pouvait pas tenir à ce que la nicotinamide était sous la forme de coenzymes ; nous avons vérifié que la courbe du développement de *Proteus* en fonction de la cozymase est une droite passant par le zéro ; l'action inhibitrice du sang semble donc bien réelle ;

2° la nicotinamide du sang total n'est pas entièrement assimilée par le *Proteus* comme en témoigne l'augmentation obtenue par chauffage.

Il semble donc préférable pour établir la valeur de la nicotinamidémie de traiter le sang comme tous les autres produits biologiques, c'est-à-dire d'effectuer le dosage sur du sang préalablement hydrolysé en milieu acide.

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE P. P. DANS L'URINE

C. Lataste a utilisé le test *Proteus* pour le dosage de la nicotinamide dans l'urine de l'homme. L'urine stérile, convenablement diluée, peut être ajoutée au milieu de culture sans aucun traitement préala-

ble. Les courbes donnant la croissance de *Proteus* en fonction de diverses quantités d'urine fraîche (stérilisée par filtration sur bougie) ne sont pas des droites mais des courbes ayant un point d'inflexion (fig. 10). Ces courbes ont été interprétées par C. Lataste de la manière suivante : certains dérivés pyridiniques présents dans l'urine (l'acide nicotinique par exemple) sont faiblement actifs en tant que facteurs

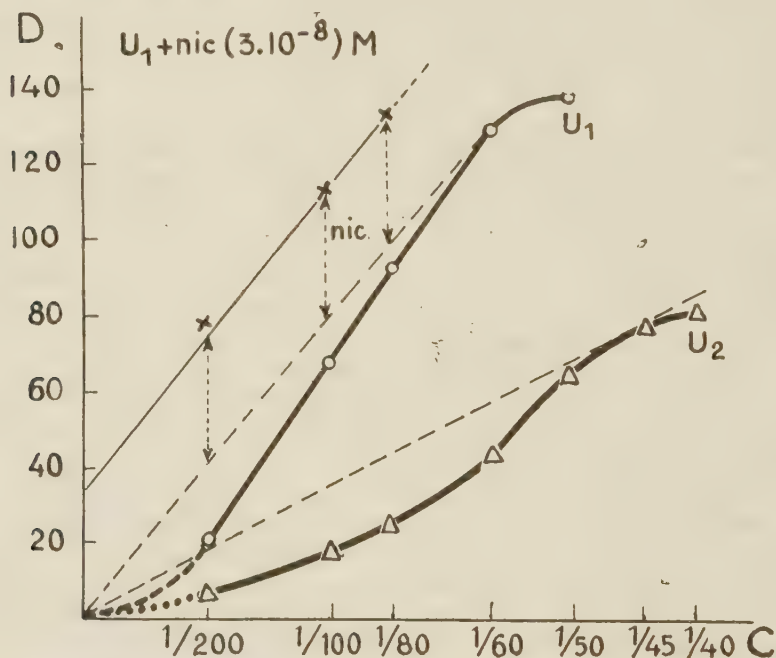


FIG. 10. — Croissance de *Proteus vulgaris* en présence d'urine additionnée ou non de nicotinamide (d'après C. Lataste).

C = concentration de l'urine.

D = densité optique des cultures exprimée par la graduation de l'électrophotomètre de Meunier.

U_1 = courbe d'une urine normale de 24 heures.

U_2 = courbe d'une urine normale de 24 heures.

$U_1 + \text{nic } 3 \times 10^{-8} \text{ M}$ = courbe du mélange urine + nicotinamide $3 \times 10^{-8} \text{ M}$.

nic = densité optique de la culture correspondant à une concentration en nicotinamide $3 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Traits discontinus - - - = courbe théorique ; on remarquera que la courbe théorique de U_1 se confond avec la parallèle à la courbe ($U_1 + \text{nic } 3 \times 10^{-8} \text{ M}$) et qu'elle est distante de cette dernière de la valeur propre de la culture donnée par la nicotinamide.

de croissance pour *Proteus vulgaris* ; les bactéries, quand elles ont atteint un certain développement (50 à 70 divisions de l'appareil de Meunier) deviennent capables de transformer ces corps en acide nicotinique beaucoup plus actif. Pour vérifier cette hypothèse, C. Lataste a effectué l'expérience suivante : une quantité donnée de filtrat d'une

vieille culture de *Proteus vulgaris*, carencée en acide nicotinique est additionnée de 5 fois son volume d'urine ; ce mélange est maintenu à 37° pendant 4 jours. La courbe d'étalonnage obtenue est alors une droite passant par le zéro, pendant que la même urine témoin donne une courbe à inflexion. Le filtrat ne renfermait pas de facteur de croissance.

Pour chaque urine, la courbe présente une région où la proportionnalité est respectée, mais qui est très étroite, et se place dans des zones de dilutions très variables. Il faudrait donc pour saisir cette zone effectuer de nombreuses dilutions et tracer la courbe caractéristique de chaque urine. Mais ici, comme dans le cas du sang, l'addition à différentes dilutions d'urine, d'une même quantité de nicotinamide permet d'obtenir une courbe d'étalonnage qui est une droite parallèle à la courbe obtenue avec des solutions de nicotinamide. Si les abscisses sont mesurées par la quantité de nicotinamide cette courbe est parallèle à la tangente menée de l'origine à la courbe U de l'urine. L'augmentation apparente n'est plus comme pour le sang décroissante quand la concentration d'urine augmente, mais passe par un maximum, puis diminue et devient nulle. A ce point, on retrouve exactement la nicotinamide ajoutée au milieu de culture.

La technique adoptée par C. Lataste pour le dosage de la vitamine P. P. dans l'urine fraîche est donc la suivante : les différents prélèvements des urines de 24 heures, conservés à la glacière, sont rassemblés, mesurés, une portion aliquote est stérilisée par filtration. Dans les fioles d'Erlenmeyer de 100 cm³ on introduit seulement 8 cm³ de milieu puis 1 cm³ d'une solution de nicotinamide de titre $0,5 \times 10^{-7}$, 1 cm³ d'une dilution convenable d'urine (1/10 à 1/20 pour les sujets normaux). Le témoin ensemencé doit bien entendu être effectué en présence de 1 cm³ d'une solution de nicotinamide $0,5 \times 10^{-7}$.

Cette technique n'est applicable qu'à l'urine fraîche ou conservée à la glacière. C. Lataste a constaté, en effet, une augmentation de la teneur en facteur de croissance pour *Proteus vulgaris* si l'urine était conservée à la température du laboratoire ; cet auteur a étudié systématiquement l'action de la température sur des échantillons d'urine traités de façon variable et montré que l'hydrolyse en milieu acide donnait les meilleurs résultats, les conditions optima étant : acide chlorhydrique à 2 o/o, autoclavage de 3 heures à 130° (Le rapport de l'acide nicotinique trouvé avant et après hydrolyse peut varier de 4,5 à 8,8 pour des sujets normaux). Dans ces mêmes conditions l'acide nicotinique n'est pas attaqué, et le chlorure de trigonelline n'est pas transformé en substance utilisable par *Proteus vulgaris*. Par autoclavage de 3 heures à 130° en milieu acide, l'activité d'une solution d'acide nicotinurique (qui, rappelons-le, est 165 fois moins actif que la nicotinamide) n'était augmentée que de 50 o/o. Cette hydrolyse ne semble pas pouvoir expliquer, à elle seule, l'augmenta-

tion de la concentration en facteur de croissance observée dans l'urine chauffée. Il reste cependant possible que l'hydrolyse soit plus complète en présence d'urine.

Parmi les dérivés pyridiniques normaux de l'urine, se trouve le facteur V. En effet, Spiess et Koch (1939) ont montré que l'addition d'urine humaine à un milieu de culture peptoné permettait le développement de *Hemophilus parainfluenzæ*. Pittman et Fraser (1941) ont également trouvé des coenzymes dans l'urine du chien. Par une méthode basée sur la croissance de *Hemophilus parainfluenzæ*, nous avons dosé les coenzymes dans l'urine humaine. Pour une moyenne de 10 sujets, nous avons trouvé une quantité de facteurs de croissance équivalente à 1,2 mgr. de cozymase par 24 heures, correspondant à 0,2 mgr. de vitamine P. P. L'excrétion urinaire normale de vitamine P. P. varie, d'après Lataste, de 3 à 5 mgr. par 24 heures. On voit donc que la proportion de vitamine P. P. combinée sous forme de coenzyme est extrêmement faible, 1/12 à 1/20 environ de l'acide nicotinique total; par autoclavage de 3 heures à 130° en milieu acide le coefficient d'utilisation de cette fraction de la vitamine P. P. doit doubler d'après ce que nous avons vu précédemment. L'hydrolyse des coenzymes ne peut donc rendre compte de l'augmentation de la concentration en facteur de croissance observée sur l'urine chauffée.

Etant donné que l'addition de faibles quantités d'acide nicotinique à l'urine transforme la courbe d'étalonnage en une droite, il paraît vraisemblable que la vitamine P. P. n'existe sous forme libre qu'en quantité extrêmement faible. La plus grande partie serait sous forme de dérivés pyridiniques moins actifs que l'acide nicotinique en tant que facteur de croissance pour *Proteus vulgaris*. L'hydrolyse en milieu acide pendant 1 heure à 130° libérerait partiellement la vitamine P. P. de certains de ces composés.

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE P. P. DANS LE LAIT

Le lait, avant d'être introduit dans le milieu de culture, doit subir une hydrolyse avec ou sans déprotéinisation préalable. Nous avons essayé diverses méthodes d'extraction. Les techniques adoptées pour le lait de vache et le lait de femme sont légèrement différentes.

A. *Lait de vache*. — Nous avons essayé :

a) une déprotéinisation par le sulfate d'ammonium accompagnée d'une hydrolyse acide : 5 cm³ de lait sont additionnés de 0,25 cm³ d'HCl pur et de 2 cm³ de SO₄(NH₄)₂ saturé, portés à 100° pendant 10 minutes; on filtre, on neutralise et on dilue convenablement avant stérilisation;

b) une hydrolyse par SO_4H_2 à la concentration de 10 et 20 o/o ;

c) une hydrolyse par HCl à 10 ou 20 o/o ;

d) une hydrolyse par la soude à diverses concentrations, mais celle-ci s'est révélée inutilisable car il est impossible d'obtenir un filtrat limpide ;

e) une dilution au 1/5 du lait avant l'hydrolyse par HCl à 10 o/o ou 20 o/o.

Les résultats obtenus avec ces différentes techniques pour un même échantillon de lait sont consignés dans le tableau XXVI. On voit donc que par déprotéinisation par le sulfate d'ammonium, la vitamine P. P. est adsorbée sur le précipité de protéine, de même du reste que par coagulation simple par l'acide chlorhydrique ou sulfurique. Si le lait est dilué, le coagulum est très divisé et l'extraction est meilleure.

La technique adoptée pour le dosage de la vitamine P. P. dans le lait de vache est donc la suivante :

1 cm^3 de lait est additionné de 4 cm^3 d'eau bidistillée et de 1 cm^3 d'acide chlorhydrique pur ; le tout est porté à 120° pendant 20 minutes dans un tube scellé. On filtre sur filtre sans cendres, le filtrat est neutralisé par de la soude, puis amené à la dilution convenable pour le dosage avec de l'eau bidistillée (en général 1/20 est une dilution favorable) et stérilisé 20 minutes à 105° pour éviter une coloration plus grande de l'extrait. On obtient ainsi un liquide limpide mais présentant une coloration brune qui pourrait introduire une erreur dans les mesures de densité optique dans le cas où le *Protens* détruirait la substance colorée. En fait, les extraits obtenus avec le lait de vache ne sont pas très colorés, et la densité optique de la cuve contenant le liquide témoin non ensemencé est en général de 13 à 15 divisions de notre appareil de Meunier ; celle de la cuve contenant le milieu seul

Tableau XXVI

INFLUENCE DE LA DILUTION ET DE L'HYDROLYSE
SUR L'EXTRACTION DE LA VITAMINE P. P. DU LAIT

Hydrolyse de 60 minutes à 120° avec :	Mg de vitamine P. P. pour 100 cm^3 de lait
Lait non dilué + SO_4H_2 10 o/o	0,19
» » » + SO_4H_2 20 o/o	0,20
» » » + HCl 10 o/o	0,19
» » » + HCl 20 o/o	0,17
» » » + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ + HCl 5 o/o	0,13
» » » + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ + HCl 10 o/o	0,15
Lait dilué 1/5 + HCl 10 o/o	0,20
» » » + HCl 20 o/o	0,23

étant de 12. L'erreur relative supplémentaire introduite par la coloration de l'extrait est donc au maximum de 5 0 0 (les densités optiques mesurées étant de 60 divisions en général). Par ailleurs, nous avons vérifié par examen au photomètre du milieu après centrifugation des cultures que *Proteus vulgaris* ne décolorait pas le milieu.

L'application de cette technique a montré que la teneur moyenne du lait de vache en vitamine P. P. était de 0,22 mgr. pour 100 cm³ et que cette teneur n'était pas influencée par l'ingestion de nicotinamide (M. Morel et J. Baratte, 1942).

B. *Lait de femme*. — Le lait de femme est moins riche en protéines que le lait de vache et l'extraction de la vitamine P. P. sera plus aisée, mais il est beaucoup plus riche en sucre, par conséquent les extraits obtenus après chauffage en milieu acide sont très colorés. Nous avons donc préféré, pour réduire au minimum les causes d'erreur, décolorer l'extrait en milieu neutre en présence d'hydroxyde ferrique, suivant la méthode utilisée par Raoul et Crépy pour la déprotéinisation du sang. Nous avons vérifié qu'il n'y avait aucune perte de vitamine P. P. pendant cette manipulation supplémentaire.

La technique adoptée est la suivante :

5 cm³ de lait sont additionnés de 0,25 cm³ d'HCl pur et portés pendant 20 minutes à 120° en tubes scellés. Après refroidissement, on ajoute 0,75 cm³ d'eau bidistillée pour amener le volume à 6 cm³, on filtre sur filtre sans cendres et on neutralise exactement par la soude. On prélève alors une quantité de liquide correspondant à 2 cm³ de lait, qu'on introduit dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cm³. On ajoute 4 cm³ d'une solution de sulfate ferrique à 5 0 0 et la quantité d'eau bidistillée nécessaire pour amener le volume total à 20 cm³. On ajoute alors 0,5 gr. environ de carbonate de calcium bien pulvérisé. On agite et on écrase les grumeaux avec un agitateur. Il faut ensuite porter rapidement à l'ébullition après avoir ajusté la fiole d'Erlenmeyer au rodage d'un réfrigérant à reflux. Le départ de CO₂ provoque une mousse abondante. On filtre sur filtre sans cendres. L'addition de ce filtrat riche en calcium au milieu de culture entraîne la formation d'un abondant précipité qui rend le dosage impossible. Pour éliminer le calcium, le filtrat est additionné d'un volume égal du milieu de base utilisé pour les dosages, porté rapidement à l'ébullition et filtré. On obtient ainsi un liquide limpide, très peu coloré et qui ne précipite plus quand il est ajouté au milieu de culture. L'extrait obtenu correspond à une dilution de 1 pour 20. Il est stérilisé 20 minutes à 105° en tube scellé et introduit dans le milieu de culture.

Nous avons pu, en utilisant ce procédé, suivre l'évolution de la nicotinamide dans le lait de la femme après l'accouchement (A. Lwoff, M. Morel et L. Dignonnet ; A. Lwoff, M. Morel et M. Bilhaud ; A. Lwoff et M. Morel) et montrer le passage rapide dans le lait de la vitamine P. P. ingérée (A. Lwoff et M. Morel).

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE P. P.
DANS LES TISSUS ANIMAUX

La vitamine P. P. ne semble pas adsorbée sur les protéines des tissus comme sur celles du lait et l'extraction en est beaucoup plus aisée. Elle est effectuée en général avec de l'acide chlorhydrique à 10/0 ; pour le cerveau, il faut employer de l'acide à 50/0 si on veut obtenir un extrait limpide. La technique est la suivante : on effectue un prélèvement du tissu étudié (de 0,5 gr. environ en général) que l'on pèse exactement. Le tissu est alors transporté dans un mortier ; on ajoute du sable de Fontainebleau (lavé) et un volume d'acide chlorhydrique pur égal à celui de la quantité d'eau ayant même poids que la partie d'organe prélevé (par exemple, 1 cm³ pour 1 gr. d'organe) ; et quelques centimètres cubes d'eau bidistillée. Le tout est broyé très soigneusement. On amène ensuite à une dilution de 10/0 avec de l'eau bidistillée.

Le mélange est chauffé pendant 1 heure à 130° en tubes scellés. Après refroidissement, on filtre sur filtre sans cendres. On prélève une partie aliquote du filtrat que l'on amène à pH 6,8 avec de la soude normale. Au bout de quelques minutes, il se forme un précipité, très abondant pour les extraits de foie, plus légers pour ceux d'autres organes. Après filtration on amène le liquide à la concentration voulue par de l'eau bidistillée et on le stérilise en tubes scellés à 105°. Pour le foie, il faut utiliser en général des dilutions de 1 pour 2000, pour les autres tissus de 1 pour 500. Pour toutes les préparations ayant subi une hydrolyse acide, les densités optiques obtenues sont toujours proportionnelles à la concentration de l'extrait ajouté au milieu de culture ; on lit directement sur la courbe standard la quantité de nicotinamide correspondant à une densité optique donnée.

TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE P. P.
DANS LES TISSUS VÉGÉTAUX

Le problème du dosage de la vitamine P. P. dans les tissus végétaux est beaucoup plus complexe. E. Kodicek en effet a remarqué que la teneur en acide nicotinique trouvée après hydrolyse alcaline des tissus végétaux était supérieure aux valeurs obtenues après extraction en milieu neutre. Il en avait conclu que par hydrolyse alcaline, on extrait des *chromogènes*, que l'on dose par les méthodes chimiques et qui pourraient bien être totalement dépourvus de « valeur P. P. ». En fait, nous l'avons vu, les méthodes chimiques ne sont pas spécifiques

de l'acide nicotinique et peuvent donner des résultats positifs avec des dérivés pyridiniques sans valeur vitaminique.

Nous avons repris (M. Morel, 1941) le problème de la teneur en vitamine P. P. des végétaux avec le test *Proteus* qui, dans l'ensemble, réagit à l'acide nicotinique et à ses dérivés comme l'homme et le chien. Des extractions ont été effectuées pendant une heure à 130° : 1° dans l'eau bidistillée ; 2° dans l'acide chlorhydrique à 100 ; 3° dans l'acide chlorhydrique à 800 ; 4° dans la soude à 800. L'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à 800 donne des résultats identiques à l'hydrolyse par la soude à 800. Pour les tissus végétaux frais en général les résultats obtenus par extraction acide et par extraction neutre sont identiques. Par contre, pour les féculents, légumes secs, graines, etc., l'extraction par l'acide chlorhydrique à 800 donne des résultats supérieurs à celle par l'eau bidistillée. Par ailleurs, l'extrait aqueux simple traité par l'acide chlorhydrique à 800 ne montre pas de modification de sa teneur en acide nicotinique dosée par le test *Proteus*.

On pouvait envisager que par ce traitement la trigonelline était transformée en acide nicotinique. Kodicek avait choisi l'hydrolyse alcaline de préférence à l'hydrolyse acide, parce qu'il pensait que cette dernière méthode risquait de transformer la trigonelline en acide nicotinique. En effet, Jahns (1887) a transformé la trigonelline en acide nicotinique par hydrolyse acide et l'a ainsi identifiée à la méthylbétaine de l'acide nicotinique. Mais en chauffant la trigonelline avec un excès d'acide chlorhydrique vers 200°, cet auteur n'a obtenu aucune hydrolyse : la réaction commence à 240° et elle n'est complète qu'après un chauffage de 1 jour à 260°. Donc dans les conditions où sont effectuées nos expériences : HCl à 800, 1 heure à 130°, il n'y a certainement pas d'acide nicotinique libéré à partir de la trigonelline. Pour nous en assurer, nous avons fait l'expérience suivante : une solution de trigonelline à 1000 est répartie à raison de 10 cm³ par tube à essai, ceux-ci sont traités de la manière suivante :

- 1° le contenu est filtré sur bougie Chamberland L₃ ;
- 2° le tube est scellé et stérilisé 20 minutes à 120° ;
- 3° le tube est scellé et autoclavé 1 heure à 130° ;
- 4° la trigonelline est additionnée de 0,8 cm³ HCl pur et autoclavée 1 heure à 130° ;
- 5° elle est additionnée de 2,4 cm³ NaOH 40 0/0 (soit 8 0/0 de NaOH) et autoclavée 1 heure à 130°.

Le contenu des tubes 4 et 5 est ensuite neutralisé et dilué convenablement puis stérilisé. Sur ces 5 échantillons, on effectue des dosages d'acide nicotinique suivant la technique indiquée. Les solutions 2, 3 et 4 donnent sensiblement le même résultat : 100 000 γ de trigonelline permettent un développement correspondant à 0,50 γ d'acide nicotinique, il s'agit vraisemblablement d'une impureté de la substance utilisée qui n'a pas subi de purification particulière. La solution 5 est

280 fois plus active : 100 000 γ de trigonelline hydrolysée par la soude donnent un développement correspondant à 140 γ d'acide nicotinique. Une très faible proportion seulement de la trigonelline a donc été transformée en acide nicotinique.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Kodicek : les extraits obtenus en milieu alcalin sont plus actifs que ceux obtenus en milieu neutre. Mais ce n'est pas, comme le supposait cet auteur, un « chromogène » inactif que l'on extrait par hydrolyse alcaline, ce sont des substances actives pour *Proteus vulgaris* et donc probablement douées d'activité vitaminique P. P. Cependant, il est possible qu'en milieu très alcalin se produise une hydrolyse partielle de la trigonelline en acide nicotinique. Nous pouvons calculer, d'après les résultats des expériences données ci-dessus le pourcentage d'erreur possible. Soit un végétal renfermant 10 mgr. d'acide nicotinique et 100 mgr. de trigonelline. L'hydrolyse de la trigonelline donnera 0,1 mgr. d'acide nicotinique. L'erreur sur le dosage après hydrolyse alcaline sera de 1/100, c'est-à-dire inférieure aux erreurs de dosage de la méthode.

En fait, les extraits obtenus en milieu acide (8 o/o HCl) montrent à peu près la même activité que ceux obtenus en milieu alcalin (8 o/o NaOH) ; dans ce cas l'hydrolyse de la trigonelline ne peut intervenir. Par ailleurs, l'activité des extraits aqueux n'étant pas augmentée après traitement par HCl à 8 o/o, il semble bien que par l'eau bidistillée on n'extrait qu'une partie de la vitamine P. P. ; l'extraction optima étant obtenue avec 8 o/o d'HCl après autoclavage de 1 heure à 130°.

La technique de dosage de la vitamine P. P. dans les végétaux est donc la suivante : les végétaux sont finement broyés avec du sable de Fontainebleau tel que pour les végétaux frais, après chauffage en tubes scellés 1 heure à 120° dans l'eau pour les végétaux secs. On procède ensuite à une extraction par 8 o/o d'HCl en tubes scellés 1 heure à 130°. Après filtration sur filtre sans cendres l'extrait est neutralisé. Pour les végétaux pauvres en amidon, le filtrat est peu ou pas coloré, il est donc simplement dilué et stérilisé en tubes scellés à 100°. Pour les végétaux riches en réserves glucidiques, il est nécessaire de procéder à une décoloration suivant la technique utilisée pour le lait de femme.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Fildes a montré, en 1938, que la nicotinamide était le seul facteur de croissance pour *Proteus vulgaris*. Nous avons étudié le développement de ce microorganisme à l'aide de la technique de Lwoff et Querido. Ces auteurs ont montré que dans certaines conditions la croissance de la bactérie est proportionnelle à la concentration en vitamine P. P. du milieu de culture.

1. Nous avons constaté que pendant une période de 5 ans, les réactions quantitatives d'une souche de *Proteus vulgaris* à la nicotinamide peuvent rester constantes, que les bactéries soient cultivées en bouillon gélosé ou en milieu synthétique.

2. Cette stabilité des réactions quantitatives à l'acide nicotinique est sous la dépendance des conditions de culture. La souche stable (N) a été entretenue à la température du laboratoire ou à 28°. La même souche après avoir été entretenue en milieu synthétique à 37° pendant 1 an a donné une variante (P) qui a montré un besoin en acide nicotinique plus élevé que la souche normale. Le développement de la souche P en présence d'une quantité donnée de nicotinamide est de 34 o/o inférieur à celui de la souche N.

3. La transformation N $\rightarrow$ P a pu être reproduite par entretien des souches à 37° pendant 5 mois. Dans un mélange de formes N et P, à 28°, la forme N prend le dessus ; à 37° c'est la forme P qui élimine la forme N. Cependant la souche P pure est restée stable pendant 9 mois à 28°, qu'elle ait été entretenue en milieu synthétique ou en bouillon.

4. Les deux souches N et P ne se distinguent pas seulement par leur besoin en nicotinamide. Celui-ci est modifié de façon différente par l'addition de certaines substances au milieu de culture.

La vitamine B₁, l'acide *p*-aminobenzoïque et l'acide pantothénique sont sans influence sur le développement de *Proteus vulgaris* (souches N et P) en fonction de la nicotinamide.

a) Pour la souche N, le sérum frais ou hydrolysé n'exerce pas d'action sur le développement. Un mélange de 12 acides aminés provoque une augmentation moyenne de 39 o o de la croissance pour une quantité donnée de nicotinamide ; ceci n'a été observé que pour des concentrations relativement importantes en acides aminés. Les acides aminés isolés sont inactifs pour la souche N. Les nitrates augmentent

le développement de cette souche de 33 o/o en moyenne ; le fumarate possède le même effet. Les actions du mélange des acides aminés et des nitrates ne s'additionnent pas.

b) Le développement de la souche P de *Proteus vulgaris* est augmenté de 34 o/o par le sérum ou l'hydrolysate acide de sérum qui sont sans influence sur le développement de la souche N. Le mélange d'acides aminés augmente le développement de 65 o/o. L'isoleucine et l'acide aspartique, qui sont sans action sur la croissance de la souche N, favorisent celle de la souche P. Les nitrates et le fumarate n'augmentent que de 12 o/o le développement de cette souche.

5. *Proteus vulgaris*, capable d'utiliser un sel d'ammonium comme unique aliment azoté, est incapable de se multiplier lorsque celui-ci est un nitrate. La bactérie (souches N et P) réduit cependant les nitrates en nitrites, mais est incapable de réduire les nitrites.

6. *Proteus vulgaris* cultivé dans un milieu synthétique à base de sulfate d'ammonium et de glucose dans lequel la concentration en nicotinamide est le seul facteur limitant le développement bactérien présente une courbe de croissance en S caractéristique. Le temps de réduction d'une quantité déterminée de bleu de méthylène par une quantité déterminée de bactéries a été mesuré aux divers stades du cycle de la croissance. Dans les heures qui suivent le moment où la courbe de croissance passe par son point d'inflexion, le temps de réduction augmente de 15 o/o en moyenne par heure à 37°. Pendant une période de 2 à 3 heures, il est possible, par addition d'acide nicotinique, de rétablir la vitesse de réduction du bleu de méthylène à sa valeur initiale.

7. On peut, par passages successifs en présence de pyruvate de sodium comme unique aliment carboné, augmenter progressivement la vitesse de déshydrogénation du pyruvate. Cette vitesse, qui représente pour une souche normale cultivée en présence de glucose 10 o/o de la vitesse de déshydrogénation du glucose, atteint 150 o/o après 35 passages en pyruvate. Une souche cultivée en présence de pyruvate comme seul aliment carboné et dont le développement est limité uniquement par la concentration en nicotinamide montre une carence en coenzyme I et non en coenzyme II. L'usure des coenzymes est liée à leur fonctionnement.

8. Il existe une relation entre le besoin en nicotinamide de *Proteus vulgaris* et son métabolisme. La consommation en nicotinamide est plus grande en anaérobiose qu'en aérobie. L'addition d'acides aminés ou d'accepteurs d'hydrogène, au milieu, diminue le besoin en vitamine P. P. Mais les modifications observées par addition de ces substances au milieu ne sont pas les mêmes pour les souches N et P. La transformation N $\rightarrow$ P semble donc liée à une perturbation enzymatique intéressant en particulier le métabolisme de certains acides aminés.

9. La cozymase ne peut pas remplacer quantitativement la nicotinamide pour la croissance de *Proteus vulgaris*. En présence de cozymase pure stérilisée par filtration, la croissance observée est seulement 50 0/0 de celle qui correspondrait à une quantité équimoléculaire de nicotinamide. Par chauffage de 1 heure à 130° en milieu alcalin l'activité de la cozymase est légèrement augmentée. Par hydrolyse acide on libère quantitativement sous forme d'acide nicotinique la nicotinamide des coenzymes. L'hydrolyse alcaline libère vraisemblablement le pyridine-nucléoside amide nicotinique-ribose.

10. Quoiqu'il existe entre les espèces bactériennes des divergences quant aux réactions qualitatives et quantitatives, vis-à-vis des dérivés de la pyridine, on peut cependant établir par l'étude du comportement moyen un ensemble de relations entre la structure des composés et leur activité vitaminique.

a) En règle générale, la nicotinamide, l'acide nicotinique et ses sels ont la même activité. Ils permettent un développement bactérien à la concentration de $M \times 10^{-8}$.

b) Seul l'ester méthylque est aussi actif à la même concentration : l'ester éthylique est environ 10 fois moins actif, les esters propylique et butylique environ 100 fois moins.

c) Tous les dérivés de la pyridine β -substitués par un radical autre que $-\text{COOH}$ sont inactifs. Seuls la méthyl-3-pyridine et le pyridine-3-nitrile peuvent être utilisés par certaines bactéries qui doivent être capables de les transformer en acide nicotinique. Une concentration $M \times 10^{-4}$ de ces substances dans le milieu de culture est nécessaire pour obtenir un développement visible : c'est-à-dire qu'elles sont environ 10000 fois moins actives que l'acide nicotinique.

d) Seuls les dérivés β -substitués sont actifs, les acides pyridine- α et - γ -carboxyliques sont pratiquement dépourvus d'activité.

e) Une substitution quelconque dans le noyau, sauf peut-être celle d'un groupement $-\text{COOH}$ en position 2, supprime toute activité. Certains organismes en effet peuvent répondre à l'acide quinolinique ; sans doute sont-ils capables de le décarboxyler lentement.

f) La fixation sur l'N du noyau d'un groupement méthyle supprime ou diminue considérablement l'activité vitaminique ; les méthylchlorures sont plus actifs que les méthyliodures.

g) La saturation des doubles liaisons du noyau (acide nipécotique), la substitution de l'atome de C en position *para* par un atome d'N (dérivés de la pyrazine) ou l'addition d'un noyau benzénique au noyau pyridinique (noyau quinoléique) suppriment également toute activité.

11. Le test *Proteus* montre vis-à-vis des dérivés de la pyridine doués d'activité vitaminique pour l'homme et le chien une spécificité plus grande que les tests chimiques.

12. Le test *Proteus* a été appliqué au dosage de la vitamine P. P. dans le lait, dans les tissus animaux et dans les tissus végétaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER (E.), ELLIOT (S.) et ELLIOT (L.). — *Enzymologia*, **8**, 1940, 80.
- AUBEL (E.) et EGAMI (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, 248.
- AXELROD (A. E.), SPIES (T. D.) et ELVEHJEM (C. A.). — *Jl Biol. Chem.*, **139**, 1940, 667.
- BANDIER (E.). — *On nicotinic acid*. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1940.
- BANDIER (E.) et HALD (J.). — *Bioch. Jl*, **33**, 1939, 264.
- BERGEY. — *Manual of Determinative Bacteriology*. Baillière, Tindall et Cox, London, 1939.
- BILLS (C. E.), MAC DONALD (F.) et SPIES (T. D.). — *South. Med. Jl*, **32**, 1939, 793.
- BONNER (J.) et ERICKSON (J.). — *Amer. Jl Botany*, **25**, 1938, 685.
- BORDET (P.). — *Bull. Ac. Roy. Med. Belg.*, 1939, 490.
- BRAUN (H.) et VASARHELYI (J.). — *Zentralbl. Bakt.*, **127**, I, 1932, 105.
- DAVIS (D. J.). — *Jl Infect. Dis.*, **21**, 1917, 392.
- DORFMAN (A.), KOSER (S. A.), HORWITT (M.), BERKMAN (S.) et SAUNDERS (F.). — *Proceed. Soc. exp. Biol.*, **43**, 1940, 434.
- DORFMAN (A.), KOSER (S. A.), REAMES (H. R.), SWINGLE (H. F.) et SAUNDERS (F.). — *Jl Infect. Dis.*, **65**, 1939, 163.
- DORFMAN (A.), KOSER (S. A.) et SAUNDERS (F.). — *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, **43**, 1940, 391; *Jl Amer. Chem. Soc.*, **60**, 1938, 2004.
- ELVEHJEM (C. A.). — *Physiol. Rev.*, **20**, 1940, 249.
- ERLENMEYER (H.) et WÜRGLER (W.). — *Helv. chim. Acta*, **25**, 1942, 249.
- EULER (H. VON) et ADLER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, **252**, 1938, 41.
- EULER (H. VON), ADLER (E.) et STEENHOFF ERIKSEN (T.). — *Z. Physiol. Chem.*, **248**, 1937, 227.
- EULER (H. VON), ALBERS (H.) et SCHLENK (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, **240**, 1936, 113.
- EULER (H. VON), SCHLENK (F.), HEIWINKEL (H.) et HÖGBERG (B.). — *Z. Physiol. Chem.*, **256**, 1938, 268.
- FILDES (P.). — *Brit. Jl exp. Path.*, **19**, 1938, 239; **21**, 1940, 67.
- FRASER (H. F.), TOPPING (N. H.) et SEBRELL (W. H.). — *Publ. Health Rep.*, **53**, 1938, 1836.
- FUNK (C.). — *Jl Physiol.*, **44**, 1913, 50; *Die Vitamin*, 1922, 174.
- GAIL (G.). — *Inaugural dissertation*. Marburg, 1899.
- GLADSTONE (G. P.). — *Brit. Jl exp. Path.*, **20**, 1939, 189.
- HANDLER (P.) et DANN (W. J.). — *Jl Biol. Chem.*, **140**, 1941, 739.
- HARRIS (L. J.) et RAYMOND (W. D.). — *Bioch. Jl*, **33**, 1939, 2037.
- HAUSER (G.). — *Ueber Faulnisbakterien*. Leipzig, 1885, p. 173.
- HORIOT (M.). — *Thèse Doctorat en Médecine*. Maloine, édit., Paris, 1942.
- HUBER (C.). — *Liebigs Ann. Chem.*, **141**, 1867, 271.
- ISELL (H.), WOOLEY (J. G.), BUTLER (R. E.) et SEBRELL (W. H.). — *Jl Biol. Chem.*, **139**, 1940, 499.
- JAHNS (E.). — *Ber. deuts. Chem. Gesell.*, **20**, 1887, 2840.

- JUSTIN-BESANÇON (L.) et LWOFF (A.). — *Vitamine antipellagreuse et Avitaminoses nicotiniques*. Masson, édit., Paris, 1942.
- KARRER (P.) et KELLER (H.). — *Helv. Chem. Acta*, **21**, 1938, 463 et 1170.
- KARRER (P.) et WARBURG (O.). — *Bioch. Z.*, **285**, 1936, 297.
- KNIGHT (B. C. J. G.). — *Bioch. Jl*, **32**, 1938, 1241.
- KNIGHT (B. C. J. G.) et MAC ILWAIN (H.). — *Bioch. Jl*, **32**, 1938, 1241.
- KODICEK (E.). — *Bioch. Jl*, **34**, 1940, 712.
- KOHN (H. I.). — *Bioch. Jl*, **12**, 1938, 2075.
- KOHN (H. I.) et BERNHEIM (F.). — *The Jl Clinie Investig.*, **18**, 1939, 585.
- KÖNIG (W.). — *Jl f. prakt. Chem.*, **178** (NF., 70), 1904, 19-36.
- KOSER (S. A.), BERKMAN (S.) et DOREMAN (A.). — *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, **47**, 1941, 504.
- KRISTAD (H.) et NÆSS (T.). — *Z. Physiol. Chem.*, **260**, 1939, 108.
- LANDY (M.). — *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, **38**, 1938, 504.
- LATASTE (C.). — *Bull. Soc. Path. exot.*, **32**, 1939, 784.
- LOYD (D. I.) et SHORE (A.). — *Chemistry of Proteins*. Londres, 1938.
- LWOFF (A.) et LWOFF (M.). — *Proceed. Roy. Soc. London*, **122**, 1937, 352 et 373.
- LWOFF (A.) et MOREL (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, **136**, 1942, 187 et 192.
- LWOFF (A.), MOREL (M.) et BILHAUD (M.). — *C. R. Acad. Sci.*, **214**, 1942, 39.
- LWOFF (A.), MOREL (M.) et DIGONNET (L.). — *C. R. Acad. Sci.*, **213**, 1941, 811.
- LWOFF (A.) et QUERIDO (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, 1039; **130**, 1939, 1569; in LWOFF (A.), *Semaine des Hôpitaux Paris*, **47**, 1941, 749.
- LWOFF (A.), QUERIDO (A.) et LATASTE (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, 1580.
- MACHEK (G.). — *Monatshette f. Chemie*, **72**, 1939, 90.
- MAC KIBBIN (J. M.) et ELVEHJEM (C. A.). — *In ELVEHJEM, Phys. Rev.*, **20**, 1940, 249.
- MANN (P. J. G.) et QUASTEL (J. H.). — *Bioch. Jl*, **35**, 1941, 502.
- MATTI (J.), NITTI (F.), MOREL (M.) et LWOFF (A.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **67**, 1941, 240.
- MELNICK (D.) et FIELD (H.). — *Jl Biol. Chem.*, **134**, 1940, 1.
- MEUNIER (P.). — *Bull. Soc. Chimie biol.*, **29**, 1937, 113.
- MÖLLER (E. F.) et BIRKOFER (L.). — *Ber.*, **75**, 1942, 1108.
- MOREL (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **67**, 1941, 285 et 449; *C. R. Acad. Sci.*, **213**, 1941, 530.
- MOREL (M.) et BARATTE (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **68**, 1942, 538.
- MUELLER (H.). — *Jl Biol. Chem.*, **120**, 1937, 219.
- PEARSON (P. B.). — *Jl Biol. Chem.*, **129**, 1939, 491.
- PELCZAR (M. J.) et PORTER (J. R.). — *Jl of Bact.*, **39**, 1940, 429.
- PITTMAN (M.) et FRASER (H. P.). — *Publ. Health Rep.*, **55**, 1941, 915.
- QUASTEL (J. H.) et WOOLDRIDGE (W. R.). — *Bioch. Jl*, **19**, 1925, 653.
- RAOUL (Y.) et CRÉPY (O.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, 1941, 362.
- RAYBURN (B. C. H.), HARLAN (W. R.) et HANMER (H. R.). — *Jl Am. Chem. Soc.*, **63**, 1941, 115.
- RITSERT (D. K.). — *Klin. Woch.*, **18**, 1939, 934.
- RIVERS (T. M.). — *Johns. Hopk. Hosp. Bull.*, **33**, 1922, 149.
- SAUNDERS (F.), DOREMAN (A.) et KOSER (S. A.). — *Jl of Biol. Chem.*, **138**, 1941, 69.
- SCHLENK (F.), EULER (H. VON), HEIWINKEL (H.), GLEIM (W.) et NYRSTRÖM (H.). — *Zeit. Phys. Chem.*, **247**, 1937, 23.
- SCHMELKES (F. C.). — *Science*, **90**, 1939, 113.
- SCHULTZ (F. VON). — *Zeit. Physiol. Chem.*, **272**, 1942, 29.
- SNELL (E.) et WRIGHT (L.). — *Jl Biol. Chem.*, **139**, 1940, 675.
- SPIEGEL (L.). — *Ber.*, **32-33**, 1899, 2834.
- SPIES (T. D.), BEAN (W. B.) et STONE (R. E.). — *Jl Amer. Med. Assoc.*, **111**, 1938, 584.
- SPIES (T. D.), COOPER (C.) et BLANKENHORN (M. A.). — *Jl Amer. Med. Assoc.*, **111**, 1938, 622.

- SPIES (T. D.) et KOCH. — *In* VILTER (R. W.), VILTER (S. P.) et SPIES (T. D.), *Amer. Jl of Med. Sci.*, **197**, 1939, 322.
- SUZUKI (U.), SHIMAMURA (T.) et ODAKE (S.). — *Bioch. Zeit.*, **13**, 1912, 89.
- SWAMINATHAN (M.). — *Ind. Jl Med. Res.*, **26**, 1938, 427.
- THJÖTTA (T.) et AVERY (O. T.). — *Jl exp. Med.*, **34**, 1921, 97 et 445.
- TREPOUËL (Th. M^{me}) et MOREL (M.). — *In* JUSTIN-BESANÇON et LWOFF.
- VILTER (S. P.) et SPIES (T. D.). — *Lancet*, 1939, 423.
- VILTER (S. P.), SPIES (T. D.) et MATHEWS (A. P.). — *Jl Biol. Chem.*, **125**, 1938, 85.
- VILTER (S. P.), BEAN (W. B.) et SPIES (T. D.). — *South. Med. Jl*, **31**, 1938, 1163.
- VONGERICHTEN (E.). — *Ber. Deut. Chem. Gesell.*, **32** (3), 1899, 2571.
- WARBURG (O.) et CHRISTIAN (W.). — *Bioch. Zeit.*, **254**, 1932, 438.
- WEIL (E.) et FELIX (L.). — *Zeit. f. Immun. Forsch.*, **31**, I orig., 1921, 457.
- WOODS (D. O.). — *Brit. Jl exp. Path.*, **21**, 1940, 84.
- WOOLEY (D. W.), STRONG (F. M.), MADDEN (R. J.) et ELVEHJEM (C. A.). — *Jl Biol. Chem.*, **124**, 1938, 715.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Méthodes modernes de détermination du poids
moléculaire des protéides.**

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 11 Juin 1943.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL MONTEL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

GILBERT GIDEL.

